

Transkriptionsfaktoren der basalen Immunität in Säugetieren und Pflanzen interagieren mit den gleichen *cis*-regulatorischen Elementen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Konstantin Kanofsky
aus Langen (Hessen)

1. Referent: apl. Professor Dr. Reinhard Hehl

2. Referent: Professor Dr. Karsten Hiller

eingereicht am: 29.08.2018

mündliche Prüfung (Disputation) am: 22.11.2018

Druckjahr 2018

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikation:

Kanofsky, K., Bahlmann, A.-K., Hehl, R. und Dong, D. X. (2017) Combinatorial requirement of W- and WT-boxes in microbe-associated molecular pattern-responsive synthetic promoters. *Plant Cell Rep* 36: 971 – 986

Tagungsbeiträge:

Kanofsky, K. (2016) Functional and structural conservation of MAMP-responsive *cis*-regulatory sequences between mouse and Arabidopsis. 29. Tagung Molekular Biologie der Pflanzen (23 – 26.02.2016, Wermelskirchen-Dabringhausen, Deutschland)

Posterbeiträge:

Kanofsky, K. und Hehl, R. (2017) Novel similarities in transcriptional gene expression regulation during basal immunity in mammals and plants. 30. Tagung Molekular Biologie der Pflanzen (21 – 24.02.2017, Wermelskirchen-Dabringhausen, Deutschland)

Kanofsky, K., Sandmann, A., Möller, A. und Hehl, R. (2018) Novel similarities in transcriptional gene expression regulation during basal immunity in mammals and plants. *Plant & Animal Genome Conference XXVI* (13 – 17.01.2018, San Diego, California, USA)

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Abkürzungsverzeichnis | VII |
| Abbildungs- und Tabellenverzeichnis | XII |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Tierische und pflanzliche Immunität | 1 |
| 1.1.1. Das tierische Immunsystem | 1 |
| 1.1.2. Der tierische Transkriptionsfaktor NF- κ B | 2 |
| 1.1.3. Die pflanzliche Immunabwehr | 4 |
| 1.1.4. Vergleich tierischer und pflanzlicher Immunität | 6 |
| 1.2. Identifizierung von Pathogen-responsiven <i>cis</i> -regulatorischen Sequenzen mittels bioinformatischer und experimenteller Analysen | 8 |
| 1.3. Die WT-Box als neue Elicitor-responsive <i>cis</i> -regulatorische Sequenz | 10 |
| 2. Zielsetzung | 13 |
| 3. Material und Methoden | 14 |
| 3.1. Chemikalien und Enzyme | 14 |
| 3.2. Lösungen und Medien | 14 |
| 3.2.1. Antibiotika und Herbizide | 14 |
| 3.2.2. Hormone | 15 |
| 3.2.3. Nährmedien | 15 |
| 3.2.3.1. Nährmedien zur Kultivierung von Bakterien | 15 |
| 3.2.3.2. Nährmedien zur Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 16 |
| 3.2.3.3. Nährmedien zur Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> | 17 |
| 3.2.3.4. Nährmedien zur Kultivierung von <i>Petroselinum crispum</i> | 17 |
| 3.2.4. DNA- und Gelelektrophoreselösungen | 18 |
| 3.2.5. Lösungen zur Sterilisation und Aussaat von <i>Arabidopsis thaliana</i> Samen | 19 |
| 3.2.6. Lösung zur Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen | 19 |
| 3.2.7. Lösungen zur Extraktion von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> | 20 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.2.8. | Lösungen zur Plasmidisolierung aus <i>Escherichia coli</i> | 20 |
| 3.2.9. | Lösungen zur Plasmidisolierung aus Hefezellen..... | 20 |
| 3.2.10. | Lösungen zur Isolierung und Transformation von Petersilienprotoplasten..... | 21 |
| 3.2.11. | Lösungen zur Isolierung und Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> Protoplasten..... | 22 |
| 3.2.12. | Lösungen zur Bestimmung der Proteinkonzentration | 23 |
| 3.2.13. | Lösungen des Luciferase-Assays..... | 23 |
| 3.2.14. | Lösung des β -Glucuronidase-Assays | 24 |
| 3.2.15. | Lösungen zur Transformation von Hefezellen | 24 |
| 3.2.16. | Lösungen zur denaturierenden SDS-PAGE | 25 |
| 3.2.17. | Lösungen zur Coomassie-Färbung..... | 25 |
| 3.2.18. | Western Blot Lösungen | 25 |
| 3.2.19. | Lösungen zur Überexpression und Aufreinigung His-getaggtter Proteine | 26 |
| 3.2.20. | Lösungen für Electrophoretic Mobility Shift Assays..... | 27 |
| 3.3. | Kits | 27 |
| 3.4. | Verbrauchsmaterialien..... | 28 |
| 3.5. | Geräte..... | 28 |
| 3.6. | Analysesoftware | 29 |
| 3.7. | Bakterienstämme | 29 |
| 3.8. | Hefestämme | 30 |
| 3.9. | Pflanzenmaterial..... | 30 |
| 3.10. | Primer und Oligonukleotide | 30 |
| 3.11. | <i>A. thaliana</i> Transkriptionsfaktor only-library | 30 |
| 3.12. | Peptide | 30 |
| 3.13. | Plasmide | 31 |
| 3.13.1. | pBT10GUS-d35SLUC | 31 |
| 3.13.2. | pBT10-LUC | 31 |
| 3.13.3. | pRT103-GUS..... | 32 |
| 3.13.4. | pHIS2.1 | 32 |

| | | |
|----------|--|----|
| 3.13.5. | pGADT7AD | 33 |
| 3.13.6. | pORE-O2-d35S-pA | 34 |
| 3.13.7. | pQE-Vektorsystem..... | 34 |
| 3.13.8. | pREP4..... | 35 |
| 3.13.9. | pRARE | 36 |
| 3.13.10. | UBQ10_XVE_MSC_HA_Bar..... | 36 |
| 3.14. | Antikörper | 36 |
| 3.15. | Methoden..... | 37 |
| 3.15.1. | Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> | 37 |
| 3.15.2. | Kultivierung von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 37 |
| 3.15.3. | Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 37 |
| 3.15.4. | Erstellung von Dauerkulturen | 38 |
| 3.15.5. | Sterilisation von <i>Arabidopsis thaliana</i> Samen | 38 |
| 3.15.6. | Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> | 38 |
| 3.15.7. | Stabile Transformation und Selektion von transgenen <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen | 39 |
| 3.15.8. | β -Estradiol-Behandlung von stabil transformierten <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen..... | 40 |
| 3.15.9. | Kultivierung von <i>Petroselinum crispum</i> Zellkultur..... | 40 |
| 3.15.10. | Erstellung und Bearbeitung von DNA-Konstrukten..... | 40 |
| 3.15.11. | Polymerase-Kettenreaktion..... | 40 |
| 3.15.12. | Agarose-Gelelektrophorese | 42 |
| 3.15.13. | Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen..... | 42 |
| 3.15.14. | Restriktionsspaltung von DNA-Fragmenten | 42 |
| 3.15.15. | Ligation | 43 |
| 3.15.16. | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren | 43 |
| 3.15.17. | Annealing von Oligonukleotiden | 44 |
| 3.15.18. | Phosphorylierung | 44 |
| 3.15.19. | Erstellung von Biotin-markierten Oligonukleotiden..... | 44 |
| 3.15.20. | RNA-Extraktion aus <i>Arabidopsis thaliana</i> | 45 |

| | | |
|----------|--|----|
| 3.15.21. | Reverse Transkription..... | 45 |
| 3.15.22. | Isolierung von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> | 45 |
| 3.15.23. | Herstellung und Transformation elektrokompetenter Bakterienzellen | 45 |
| 3.15.24. | Herstellung und Transformation chemisch kompetenten Bakterienzellen | 46 |
| 3.15.25. | Plasmidpräparation aus <i>Escherichia coli</i> | 47 |
| 3.15.26. | Plasmidpräparation aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 48 |
| 3.15.27. | Sequenzierung und Analyse von DNA-Molekülen..... | 48 |
| 3.15.28. | Klonierung von Reporter-genkonstrukten zur Transformationen von Protoplasten | 49 |
| 3.15.29. | Klonierung von Reporter-genkonstrukten für Yeast One-Hybrid Screens | 50 |
| 3.15.30. | Klonierung von T-DNA Konstrukten zur Überexpression von Transkriptionsfaktoren | 51 |
| 3.15.31. | Klonierung von Konstrukten zur Expression und Aufreinigung in <i>Escherichia coli</i> | 53 |
| 3.15.32. | Isolierung und Transformation von Petersilienprotoplasten | 54 |
| 3.15.33. | Isolierung und Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> Protoplasten | 55 |
| 3.15.34. | Proteinbestimmung nach Bradford | 57 |
| 3.15.35. | Luciferase-Assay | 58 |
| 3.15.36. | β -Glucuronidase-Assay | 59 |
| 3.15.37. | Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 60 |
| 3.15.38. | Erstellung und Analyse eines Bait-Stammes für einen Yeast One-Hybrid Screen..... | 61 |
| 3.15.39. | Yeast One-Hybrid Screen mit einer Transkriptionsfaktor <i>only-library</i> | 62 |
| 3.15.40. | Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 63 |
| 3.15.41. | Coomassie-Färbung von PAGE-Gelen..... | 65 |
| 3.15.42. | Western Blot..... | 65 |
| 3.15.43. | Überexpression und Aufreinigung rekombinanter Proteinen in <i>Escherichia coli</i> | 66 |
| 3.15.44. | Dialyse | 67 |
| 3.15.45. | Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) | 67 |
| 4. | Ergebnisse..... | 71 |
| 4.1. | Vorhersage und Analyse der Interaktion des murinen NF- κ B p65 mit WT-Box beinhaltenden <i>cis</i> -Sequenzen | 71 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 4.1.1. | Vorhersage einer potentiellen Interaktion des murinen NF-κB p65 mit WT-Boxen..... | 71 |
| 4.1.2. | NF-κB p65 aktiviert Reportergenaktivität in Pflanzenzellen | 72 |
| 4.1.3. | Differentielle Regulation der NF-κB p65 vermittelten Reportergenaktivität durch WT-Box enthaltende <i>cis</i> -Sequenzen der Motivgruppe 27..... | 74 |
| 4.1.4. | Die WT-Boxen in <i>cis</i> -Sequenz 15 sind verantwortlich für die NF-κB p65 regulierte Reportergenexpression | 76 |
| 4.1.5. | MAMP- und NF-κB p65-responsive Reportergenaktivitäten benötigen die WT-Box aus der <i>cis</i> - Sequenz 18 | 78 |
| 4.1.6. | Die WT-Box in <i>cis</i> -Sequenz 24 ist verantwortlich für die NF-κB p65 regulierte Reportergenexpression | 82 |
| 4.1.7. | MAMP- und NF-κB p65-responsive Reportergenaktivitäten benötigen die WT-Box ähnliche Sequenz aus dem <i>PR1</i> Promotor | 84 |
| 4.1.8. | Die WT-Boxen sind notwendig für die MAMP-responsive Genexpression in <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i> Protoplasten..... | 87 |
| 4.1.9. | Untersuchung der NF-κB p65 vermittelten Reportergenexpression in <i>Arabidopsis thaliana</i> 89 | |
| 4.1.10. | NF-κB p65 bindet <i>in vitro</i> direkt an die WT-Box beinhaltenden synthetischen Promotoren | 91 |
| 4.1.11. | Die WT-Boxen werden für eine direkte Interaktion von NF-κB p65 mit den synthetischen Promotoren benötigt | 92 |
| 4.2. | Analyse der mit Sequenz 24 interagierenden WRKY Faktoren | 96 |
| 4.2.1. | WRKY26, 40 und 41 reprimieren die Sequenz 24 regulierte Reportergenaktivität | 96 |
| 4.2.2. | WRKY41AD reguliert die Sequenz 24 vermittelte Reportergenaktivität unabhängig der WT- Box in Pflanzenzellen..... | 98 |
| 4.2.3. | WRKY26AD reguliert die Sequenz 24 vermittelte Reportergenaktivität abhängig von den W- und WT-Boxen in Pflanzenzellen..... | 100 |
| 4.2.4. | Die WT- und W-Boxen sind für die direkte Interaktion zwischen WRKY26 und der <i>cis</i> -Sequenz 24 notwendig..... | 102 |
| 4.3. | Analyse der MAMP-responsiven <i>cis</i> -Sequenz 18 | 104 |
| 4.3.1. | WRKY40 interagiert mit Sequenz 18 in Hefezellen | 104 |
| 4.3.2. | WRKY40 reprimiert die Sequenz 18 regulierte Reportergenaktivität | 105 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 4.3.3. | Identifizierung des WRKY40 responsiven Bereichs in der <i>cis</i> -Sequenz 18..... | 106 |
| 5. | Diskussion..... | 108 |
| 5.1. | In einem kombinatorischen Element wird die Typ II WT-Box zu einer WRKY Bindestelle..... | 108 |
| 5.2. | Der Einfluss von WRKY26, 40, 41 und 70 auf die <i>cis</i> -Sequenz 24 vermittelte Expression | 111 |
| 5.3. | Der murine NF- κ B p65 interagiert mit MAMP-responsiven <i>cis</i> -Sequenzen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> | 114 |
| 5.4. | Gibt es strukturelle Ähnlichkeiten zwischen WRKY und NF- κ B und deren induzierten Signalwegen?..... | 115 |
| 6. | Zusammenfassung..... | 119 |
| 7. | Literaturverzeichnis..... | 120 |
| 8. | Anhang..... | 130 |
| 8.1. | Reportergenaktivitäten des transienten Reporter-gen-Assays..... | 130 |
| 8.2. | Auflistung der Enzymaktivitäten und Induktionsfaktoren des transienten Reporter-gen-Assays | 131 |
| 8.3. | 3-AT-Test der verschiedenen Bait-Stämme..... | 183 |
| 8.4. | Ergebnisse des Yeast One-Hybrid Screen..... | 184 |
| 8.5. | Charakterisierung der stabil transformierten β -Estradiol induzierbaren p65 <i>Arabidopsis thaliana</i> Linien | 187 |
| 8.6. | Aufreinigung der <i>E. coli</i> exprimierten Proteine..... | 198 |
| 8.7. | Unabhängige Wiederholungen der EMSA Experimente | 200 |
| 9. | Materialliste | 206 |
| 9.1. | Glycerinkulturen und DNA-Konstrukte | 206 |
| 9.2. | Primer und Oligonukleotide | 210 |
| 10. | Danksagung | 214 |

Abkürzungsverzeichnis

| Abkürzungen | Bedeutung |
|--------------------|---|
| 2,4-D | 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure |
| 3-AT | 3-Amino-1,2,4-triazole |
| 4-IPBA | 4-Iodo-Phenylboronsäure |
| 4-MU | 4-Methylumbelliferon |
| 4-MUG | 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid |
| A | Adenin |
| A | Ampere |
| AD | Aktivierungsdomäne |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| AmpR | Ampicillin-Resistenz |
| ANK | <i>ankyrin repeats</i> |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ARS | <i>autonomously replicating sequence</i> |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| ATR1 | <i>arabidopsis thaliana recognized 1</i> |
| BCL | <i>mucosal-associated lymphoid tissue-lymphoma-associated protein</i> |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| bzw | beziehungsweise |
| bZIP | <i>basic-domain leucin-zipper</i> |
| C | Celsius |
| C | Cytosin |
| ca | circa |
| CaMV | Cauliflower Mosaik Virus |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CEN | <i>autonomously replicating sequence</i> |
| Col-0 | Columbia 0 |
| CRM | <i>cis</i> -regulatorisches Modul |
| C-terminal | Carboxy-terminal |
| ddH ₂ O | doppelt destilliertes Wasser |
| dH ₂ O | destilliertes Wasser |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |

| | |
|----------------|---|
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | desoxy-Nukleosidtriphosphat |
| DOF | <i>DNA-binding with one finger</i> |
| dsDNA | doppelsträngige DNA |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| DTT | Dithiolreitol |
| EMSA | Electrophoretic Mobility Shift Assay |
| <i>et. al.</i> | <i>et alii</i> (und andere) |
| ETI | <i>effector-triggered immunity</i> |
| ETS | <i>effector-triggered susceptibility</i> |
| F | Farad |
| flg22 | Flagellin 22 |
| FU | Fluoreszenz |
| <i>g</i> | Erdbeschleunigung |
| G | Guanin |
| GAL4AD | Aktivierungsdomäne des Hefetranskriptionsfaktor GAL4 |
| GRR | <i>glycin-rich region</i> |
| GUS | β-Glucuronidase |
| h | Stunde |
| His | Histidin |
| IκB | <i>inhibitor of NF-κB</i> |
| IKK | IκB Kinase Komplex |
| INA | 2,6-Dichloroisonicotinsäure |
| IPTG | Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid |
| L | Liter |
| Leu | Leucin |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| LRR | <i>leucin-rich repeats</i> |
| LS | <i>linker scanning</i> |
| LTE | Low TRIS-EDTA |
| LUC | Luciferase |
| LUCA | Letzten universellen gemeinsameren Vorfahren |
| MAGUK | <i>membrane-associated guanylate kinase homologue</i> |
| MALT | <i>mucosal-associated lymphoid tissue</i> |
| MAMP | <i>microbe associated molecule pattern</i> |

| | |
|----------------|--|
| MAP | <i>Mitogen-activated protein</i> |
| MEKK3 | <i>Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase kinase 3</i> |
| MES | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure |
| min | Minute |
| MSK | MAP-Kinase 4 Substrat |
| MTI | <i>MAMP-triggered immune response</i> |
| MYD88 | <i>myeloid differentiation primary response gene 88</i> |
| NEMO | <i>NF-κB essential modulator</i> |
| NF- κ B | <i>nuclear factor-κB</i> |
| NIM1 | <i>noninducible immunity1</i> |
| NLR | <i>Nod-like receptor</i> |
| nm | Nanometer |
| NPI | Natrium-Phosphat-Imidazol |
| NPR1 | <i>non-expresser of PR genes 1</i> |
| N-terminal | Amino-terminal |
| OD | optische Dichte |
| ori | <i>origin of replication</i> |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PAMP | <i>pathogen associated molecular pattern</i> |
| PBST | Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween-20 |
| pBT10 | pBT10GUS-d35SLUC |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglycol |
| PKC θ | <i>protein kinase Cθ</i> |
| PlnTFDB | Plant Transcription Factor Database |
| pORE | pORE-O2-d35S-pA |
| PPT | Phosphinotricin |
| PR | <i>pathogenesis related</i> |
| PRR | <i>pattern recognition receptors</i> |
| PTI | <i>PAMP-triggered immune response</i> |
| PVDF | Polyvinylidendifluorid |
| R | Resistenz |
| RHD | <i>Rel-homology domain</i> |
| RIP | <i>receptor-interacting serine/threonine kinase</i> |

| | |
|----------|--|
| RLK | <i>receptor-like kinases</i> |
| RLU | <i>relative light unit</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RPP1 | <i>recognition of peronospora parasitica 1</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-PCR | Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion |
| s.o. | siehe oben |
| SAR | systemisch erworbenen Resistenz |
| SDS | Natriumlaurylsulfat |
| sec | Sekunde |
| ssRNA | einzelsträngige RNA |
| Std.abw. | Standardabweichung |
| T | Thymin |
| TAB | <i>TAK-binding protein</i> |
| TAE | TRIS-Acetat-EDTA |
| TAK | <i>transforming-growthfactor-β-activated kinase</i> |
| TATA | TATA Box (Minimalpromotor) |
| TBE | TRIS-Borat-EDTA |
| TBP | TATA Box binde Protein |
| TCR | T-Zell Rezeptoren |
| TD | Transaktivierungsdomäne |
| T-DNA | Transfer-DNA |
| TE | TRIS-EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TIR | <i>Toll-like interleukin-1 receptor</i> |
| TLR | <i>Toll-like receptor</i> |
| TNF | <i>tumour-necroses factor</i> |
| TNFR | TNF Rezeptor |
| Tnos | Nopalin Synthase Terminatoren |
| TRADD | <i>TNF receptor associated via death domain</i> |
| TRIS | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| tRNA | Transfer-RNA |
| Trp | Tryptophan |
| UV | Ultraviolett |

| | |
|------|--------------|
| V | Volt |
| W | Watt |
| z.B. | zum Beispiel |

Abkürzungen von Artnamen

| | |
|-----------------------|----------------------------------|
| <i>A. thaliana</i> | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| <i>A. tumefaciens</i> | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>M. musculus</i> | <i>Mus musculus</i> |
| <i>P. crispum</i> | <i>Petroselinum crispum</i> |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: NF- κ B Familienmitglieder (Li und Verma, 2002) | 3 |
| Abbildung 2: Aktivierung von NF- κ B (Li und Verma, 2002) | 4 |
| Abbildung 3: Vier Stufenmodell der Pflanzen-Pathogen-Interaktion (Bent und Mackes, 2007) | 5 |
| Abbildung 4: Neun verschiedene pflanzliche Mechanismen zur Erkennung von PAMPs und Effektoren (Kourelis und van der Hoorn, 2018) | 6 |
| Abbildung 5: Erkennung des bakteriellen Flagellins und Signalweiterleitung in tierischen und pflanzlichen Zellen (Haney <i>et al.</i> , 2014) | 7 |
| Abbildung 6: Bioinformatische und experimentelle Analyse zur Identifizierung von neuen Pathogen-responsiven <i>cis</i> -regulatorischen Sequenzen (Koschmann <i>et al.</i> , 2012) | 9 |
| Abbildung 7: Elicitor-responsive <i>cis</i> -regulatorische Sequenzen der Motivgruppe 27 (nach Koschmann <i>et al.</i> , 2012)..... | 11 |
| Abbildung 8: pBT10GUS-d35SLUC Vektor (modifiziert nach Koschmann <i>et al.</i> , 2012)..... | 31 |
| Abbildung 9: Vektorkarte von pBT10-LUC..... | 32 |
| Abbildung 10: pHIS2.1 Vektorkarte (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) | 33 |
| Abbildung 11: Vektorkarte von pGADT7AD (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)..... | 33 |
| Abbildung 12: T-DNA Vektor pORE-O2-d35S-pA..... | 34 |
| Abbildung 13: pQE-30 Vektorkarte (Qiagen, Hilden, Deutschland) | 35 |
| Abbildung 14: Vektor pREP4 (Qiagen, Hilden, Deutschland) | 35 |
| Abbildung 15: Karte der β -Estradiol induzierbaren Expressionskassette im pGPTV II Vektor (Schlücking <i>et al.</i> , 2013)..... | 36 |
| Abbildung 16: Tetramerisierung der <i>cis</i> -Elemente im Vektor pBT10GUS-d35SLUC | 50 |
| Abbildung 17: Tropfschema zur Bestimmung der Hintergrundaktivität des Bait-Stammes..... | 61 |
| Abbildung 18: Die verschiedenen NF- κ B p65 Konstrukte aktivieren die Reporter-genaktivität in Petersilienprotoplasten..... | 73 |
| Abbildung 19: NF- κ B p65 reguliert die Reporter-genaktivitäten der <i>cis</i> -Sequenzen aus Motivgruppe 27 unterschiedlich | 75 |
| Abbildung 20: Die WT-Boxen in Sequenz 15 sind für die NF- κ B p65 aktivierte Reporter-genexpression in Petersilienprotoplasten verantwortlich | 77 |
| Abbildung 21: Pep25-Responsivität verschiedener Mutationen der Sequenz 18 in Petersilienprotoplasten..... | 79 |
| Abbildung 22: Die WT-Box und zwei weitere Bereiche in Sequenz 18 sind verantwortlich für die NF- κ B p65 vermittelte Reporter-genexpression | 81 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 23: Die WT-Box in <i>cis</i> -Sequenz 24 ist verantwortlich für die NF- κ B p65 Aktivierung der Reporterexpression in Petersilienprotoplasten | 83 |
| Abbildung 24: Die WT-Box in PR1 ₆₅₀₋₆₀₀ ist verantwortlich für eine Pep25 vermittelte Reporterexpression in Petersilienprotoplasten | 85 |
| Abbildung 25: Die WT-Box in PR1 ₆₅₀₋₆₀₀ ist verantwortlich für die NF- κ B p65 aktivierte Reporterexpression in Petersilienprotoplasten | 86 |
| Abbildung 26: Die WT-Boxen sind notwendig für eine flg22-induzierte Reporteraktivität in <i>Arabidopsis thaliana</i> Protoplasten | 88 |
| Abbildung 27: Die NF- κ B p65 regulierte Reporteraktivität vermittelt durch den nativen WRKY30-Promotor ist sehr gering..... | 90 |
| Abbildung 28: NF- κ B p65 bindet <i>in vitro</i> an die WT-Box beinhaltenden Sequenzen 15, 24 und PR1 ₆₅₀₋₆₀₀ | 92 |
| Abbildung 29: NF- κ B p65 bindet <i>in vitro</i> abhängig der WT-Boxen an die Sequenz 15, 24 und PR1 ₆₅₀₋₆₀₀ | 95 |
| Abbildung 30: WRKY26, 40 und 41 reprimieren die MAMP-responsive Reporterexpression | 97 |
| Abbildung 31: WRKY41AD aktiviert die Sequenz 24 vermittelte Reporteraktivität..... | 99 |
| Abbildung 32: WRKY26AD aktiviert die Sequenz 24 vermittelte Reporteraktivität..... | 101 |
| Abbildung 33: WRKY26 bindet <i>in vitro</i> abhängig von den W- und WT-Boxen an die Sequenz 24..... | 103 |
| Abbildung 34: Yeast One-Hybrid Analyse der Retransformation von WRKY40 in den <i>cis</i> -Sequenz 18 Bait-Stamm | 105 |
| Abbildung 35: Die MAMP-responsive Sequenz 18 vermittelte Reporteraktivität wird durch WRKY40 reprimiert | 106 |
| Abbildung 36: Pep25-Responsivität zweier verschiedener Doppelmutationen der Sequenz 18 in Petersilienprotoplasten..... | 130 |
| Abbildung 37: Pep25-Responsivität verschiedener Doppelmutationen der Sequenz 18 in Petersilienprotoplasten..... | 131 |
| Abbildung 38: Bestimmung der 3-AT Konzentration zur Inhibierung der Hintergrundexpression von <i>HIS3</i> in den unterschiedlichen <i>cis</i> -Sequenz 18 Bait-Stämmen der Hefe | 183 |
| Abbildung 39: Yeast One-Hybrid Analyse der Retransformation der unterschiedlichen Prey Proteine in dem <i>cis</i> -Sequenz 18 Bait-Stamm | 186 |
| Abbildung 40: Genotypisierung der unterschiedlichen stabil integrierten NF- κ B p65 <i>Arabidopsis thaliana</i> Linien | 187 |
| Abbildung 41: Die Transkription von NF- κ B p65 ist durch β -Estradiol in stabil transformierten <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen induzierbar..... | 188 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 42: Western Blot Analyse der verschiedenen NF- κ B p65 stabil transformierten <i>Arabidopsis thaliana</i> Linien | 189 |
| Abbildung 43: Semiquantitative RT-PCR potentieller NF- κ B p65 regulierter Zielgene aus β -Estradiol behandelten stabil transformierten NF- κ B p65 <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen..... | 197 |
| Abbildung 44: Aufreinigungen von <i>E. coli</i> exprimiertem NF- κ B p65..... | 198 |
| Abbildung 45: Aufreinigung von <i>E. coli</i> exprimiertem WRKY26..... | 199 |
| Abbildung 46: Unabhängige Wiederholung des EMSAs mit NF- κ B p65 und den <i>cis</i> -Sequenzen 15, 24 und PR1 ₆₅₀₋₆₀₀ | 200 |
| Abbildung 47: Zweite unabhängige Wiederholung des EMSAs mit NF- κ B p65 und den <i>cis</i> -Sequenzen 15, 24 und PR1 ₆₅₀₋₆₀₀ | 201 |
| Abbildung 48: Unabhängige Wiederholung des EMSAs mit NF- κ B p65 und den Sequenzen 15, 24 und PR1 ₆₅₀₋₆₀₀ | 202 |
| Abbildung 49: Zweite unabhängige Wiederholung des EMSAs mit NF- κ B p65 und den Sequenzen 15, 24 und PR1 ₆₅₀₋₆₀₀ | 203 |
| Abbildung 50: Unabhängige Wiederholung des EMSAs mit WRKY26 und der radioaktiv markierten <i>cis</i> -Sequenz 24 als Sonde | 204 |
| Abbildung 51: Zweite unabhängige Wiederholung des EMSAs mit WRKY26 und der radioaktiv markierten <i>cis</i> -Sequenz 24 als Sonde..... | 205 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Tabelle 1: Zwei verschiedene Typen von WT-Boxen..... | 12 |
| Tabelle 2: Antikörper | 36 |
| Tabelle 3: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes mit dazugehörigem PCR-Programm..... | 41 |
| Tabelle 4: Typischer Restriktionsansatz | 43 |
| Tabelle 5: Typischer Ligationsansatz | 43 |
| Tabelle 6: Ansatz zur Phosphorylierung von annealten Oligonukleotiden | 44 |
| Tabelle 7: EMSA 6 % Acrylamidgel | 68 |
| Tabelle 8: EMSA Bindungsansatz von NF- κ B p65 | 69 |
| Tabelle 9: EMSA Bindungsansatz für WRKY26 | 69 |
| Tabelle 10: FootprintDB vorhergesagte Interaktion des murinen NF- κ B p65 mit den WT-Boxen..... | 72 |
| Tabelle 11: Zusammenstellung der pflanzlichen WRKY (<i>A. thaliana</i>) und tierischen NF- κ B p65 (<i>M. musculus</i>) Bindestellen..... | 116 |
| Tabelle 12: Normierte GUS-Werte der Kotransformation der <i>cis</i> -Sequenz 24 im pBT10 Vektor zusammen mit den verschiedenen NF- κ B p65 Konstrukten im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 18) | 131 |
| Tabelle 13: Normierte GUS-Werte der Kotransformation von NF- κ B p65 mit den verschiedenen Tetrameren der <i>cis</i> -Sequenzen aus Motivgruppe 27 im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 19)..... | 133 |
| Tabelle 14: Induktionsfaktoren der Kotransformation von NF- κ B p65 mit den verschiedenen Tetrameren der <i>cis</i> -Sequenzen aus Motivgruppe 27 im Petersilienprotoplastensystem (Werte aus Tabelle 13 und Abbildung 19) | 136 |
| Tabelle 15: Normierte GUS-Werte der Kotransformation von NF- κ B p65 mit den Tetrameren der <i>cis</i> -Sequenzen 15 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 20)..... | 138 |
| Tabelle 16: Induktionsfaktoren der Kotransformation von NF- κ B p65 mit den Tetrameren der <i>cis</i> -Sequenzen 15 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (Werte aus Tabelle 15 und Abbildung 20) | 140 |
| Tabelle 17: Normierte GUS-Werte nach Pep25-Behandlung der Transformation der Tetramere der <i>cis</i> -Sequenzen 18 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 21A)..... | 141 |
| Tabelle 18: Normierte GUS-Werte nach Pep25-Behandlung der Transformation der Tetramere der <i>cis</i> -Sequenzen 18 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 21B)..... | 143 |

| | |
|--|-----|
| Tabelle 19: Normierte GUS-Werte nach Pep25-Behandlung der Transformation der Tetramere der <i>cis</i> -Sequenzen 18 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 36) | 146 |
| Tabelle 20: Normierte GUS-Werte nach Pep25-Behandlung der Transformation der Tetramere der <i>cis</i> -Sequenzen 18 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 37; in Zusammenarbeit mit Laureen Arndt gemessen) . | 147 |
| Tabelle 21: Normierte GUS-Werte der Kotransformation von NF- κ B p65 mit den Tetrameren der <i>cis</i> -Sequenzen 18 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 22A; Werte in Zusammenarbeit mit Marcel Staar (2017) gemessen) | 148 |
| Tabelle 22: Induktionsfaktoren der Kotransformation von NF- κ B p65 mit den Tetrameren der <i>cis</i> -Sequenzen 18 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (Werte aus Tabelle 21 und Abbildung 22B; Werte in Zusammenarbeit mit Marcel Staar (2017) gemessen) | 149 |
| Tabelle 23: Normierte GUS-Werte der Kotransformation von NF- κ B p65 mit den Tetrameren der <i>cis</i> -Sequenzen 18 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 22C; Werte in Zusammenarbeit mit Marcel Staar (2017) gemessen) | 151 |
| Tabelle 24: Induktionsfaktoren der Kotransformation von NF- κ B p65 mit den Tetrameren der <i>cis</i> -Sequenzen 18 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (Werte aus Tabelle 23 und Abbildung 22D; Werte in Zusammenarbeit mit Marcel Staar (2017) gemessen) | 154 |
| Tabelle 25: Normierte GUS-Werte der Kotransformation von NF- κ B p65 mit den Tetrameren der <i>cis</i> -Sequenzen 24 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 23) | 156 |
| Tabelle 26: Induktionsfaktoren der Kotransformation von NF- κ B p65 mit den Tetrameren der <i>cis</i> -Sequenzen 24 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (Werte aus Tabelle 25 und Abbildung 23) | 158 |
| Tabelle 27: Normierte GUS-Werte nach Pep25-Behandlung der Transformation der Tetramere des PR1 ₆₅₀₋₆₀₀ Promotorfragments und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 24) | 159 |
| Tabelle 28: Normierte GUS-Werte der Kotransformation von NF- κ B p65 mit den Tetrameren des PR1 ₆₅₀₋₆₀₀ Promotorfragments und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 25; Werte in Zusammenarbeit mit Anika Möller (2016) gemessen) | 160 |

| | |
|--|-----|
| Tabelle 29: Induktionsfaktoren der Kotransformation von NF- κ B p65 mit den Tetrameren des PR1 ₆₅₀₋₆₀₀ Promotorfragments und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (Werte aus Tabelle 28 und Abbildung 25; Werte in Zusammenarbeit mit Anika Möller (2016) gemessen)..... | 162 |
| Tabelle 30: Normierte LUC-Werte nach flg22-Behandlung der Transformation der Tetramere der <i>cis</i> -Sequenz 15 und entsprechenden Mutationen in <i>Arabidopsis thaliana</i> Protoplasten (Werte aus Abbildung 26A; Werte in Zusammenarbeit mit Alexander Sandmann (2017) gemessen) | 163 |
| Tabelle 31: Normierte LUC-Werte nach flg22-Behandlung der Transformation der Tetramere der <i>cis</i> -Sequenz 24 und entsprechenden Mutationen in <i>Arabidopsis thaliana</i> Protoplasten (Werte aus Abbildung 26C; Werte in Zusammenarbeit mit Alexander Sandmann (2017) gemessen) | 164 |
| Tabelle 32: Normierte LUC-Werte nach flg22-Behandlung der Transformation der Tetramere der <i>cis</i> -Sequenz 18 und entsprechenden Mutationen in <i>Arabidopsis thaliana</i> Protoplasten (Werte in Zusammenarbeit mit Alexander Sandmann (2017) gemessen) | 164 |
| Tabelle 33: Normierte LUC-Werte der Kotransformation von NF- κ B p65 zusammen mit dem Tetramer von Sequenz 24 und dem nativen WRKY30-Promotor in <i>Arabidopsis thaliana</i> Protoplasten (Werte in Zusammenarbeit mit Lena Meißner gemessen; Werte aus Abbildung 27) | 165 |
| Tabelle 34: Induktionsfaktoren der Kotransformation von NF- κ B p65 zusammen mit dem Tetramer von Sequenz 24 und dem nativen WRKY30-Promotor in <i>Arabidopsis thaliana</i> Protoplasten (Werte in Zusammenarbeit mit Lena Meißner gemessen; Werte aus Tabelle 33 und Abbildung 27)..... | 165 |
| Tabelle 35: Normierte GUS-Werte nach Pep25-Behandlung der Kotransformation von WRKY26 mit dem Tetramer der <i>cis</i> -Sequenz 24 im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 30A; Werte in Zusammenarbeit mit Ann-Kathrin Bahlmann (2017) gemessen; <i>t</i> -Test im Vergleich zur GUS-Aktivität von S24 + WRKY26 – Pep25 mit S24 + WRKY26 + Pep25 ergibt einen p-Wert von 0,0030)..... | 166 |
| Tabelle 36: Normierte GUS-Werte nach Pep25-Behandlung der Kotransformation von WRKY40 mit dem Tetramer der <i>cis</i> -Sequenz 24 im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 30B; <i>t</i> -Test im Vergleich zur GUS-Aktivität von S24 + WRKY40 – Pep25 mit S24 + WRKY40 + Pep25 ergibt einen p-Wert von 0,0001) | 167 |
| Tabelle 37: Normierte GUS-Werte nach Pep25-Behandlung der Kotransformation von WRKY41 mit dem Tetramer der <i>cis</i> -Sequenz 24 im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 30C; Werte in Zusammenarbeit mit Ann-Kathrin Bahlmann (2017) gemessen; <i>t</i> -Test im Vergleich zur GUS-Aktivität von S24 + WRKY41 – Pep25 mit S24 + WRKY41 + Pep25 ergibt einen p-Wert von 0,0036)..... | 168 |
| Tabelle 38: Normierte GUS-Werte der Kotransformation von WRKY41AD mit den Tetrameren der <i>cis</i> -Sequenzen 24 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in | |

| | |
|---|-----|
| pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 31; Werte in Zusammenarbeit mit Ann-Kathrin Bahlmann (2017) gemessen) | 169 |
| Tabelle 39: Induktionsfaktoren der Kotransformation von WRKY41AD mit den Tetrameren der <i>cis</i> -Sequenzen 24 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (Werte aus Tabelle 38 und Abbildung 31; Werte in Zusammenarbeit mit Ann-Kathrin Bahlmann (2017) gemessen; <i>t</i> -Test im Vergleich zu den Induktionsfaktoren von pBT10 mit S24mut2 ergibt einen p-Wert von 0,02319, sowie von pBT10 mit S24mut4 einen p-Wert von 0,0989 und von pBT10 mit S24mut7 einen p-Wert von 0,2582) | 172 |
| Tabelle 40: Normierte GUS-Werte der Kotransformation von WRKY26AD mit den Tetrameren der <i>cis</i> -Sequenzen 24 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 32; Werte in Zusammenarbeit mit Ann-Kathrin Bahlmann (2017) gemessen) | 175 |
| Tabelle 41: Induktionsfaktoren der Kotransformation von WRKY26AD mit den Tetrameren der <i>cis</i> -Sequenzen 24 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (Werte aus Tabelle 40 und Abbildung 32; Werte in Zusammenarbeit mit Ann-Kathrin Bahlmann (2017) gemessen; <i>t</i> -Test im Vergleich zu den Induktionsfaktoren von pBT10 mit S24mut2 ergibt sich ein p-Wert von 0,0000, sowie bei pBT10 mit S24mut7 einen p-Wert von 0,8250) | 178 |
| Tabelle 42: Normierte GUS-Werte nach Pep25-Behandlung der Kotransformation von WRKY40 mit dem Tetramer der <i>cis</i> -Sequenz 18 im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 35; <i>t</i> -Test im Vergleich zur GUS-Aktivität von S18 + WRKY40 – Pep25 mit S18+ WRKY40 + Pep25 ergibt einen p-Wert von 0,0004) | 181 |
| Tabelle 43: Yeast One-Hybrid Screen mit der Mistuda <i>et al.</i> (2010) Library und dem <i>cis</i> -Sequenz 18 Bait-Stamm | 184 |
| Tabelle 44: Yeast One-Hybrid Screen mit der Mistuda <i>et al.</i> (2010) Library und dem S18mut3 Bait-Stamm | 184 |
| Tabelle 45: Bestimmung der T-DNA Integration der unterschiedlichen stabil transformierten NF- κ B p65 <i>Arabidopsis thaliana</i> Linien | 187 |
| Tabelle 46: Auflistung der verwendeten und erstellten DNA-Konstrukte und Glycerinkulturen in Bakterien | 206 |
| Tabelle 47: Auflistung der verwendeten und erstellten Glycerinkulturen in Hefe | 209 |
| Tabelle 48: Auflistung der verwendeten Primer | 210 |
| Tabelle 49: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide | 212 |

1. Einleitung

1.1. Tierische und pflanzliche Immunität

Alle Lebewesen werden von einer Vielzahl verschiedener Organismen umgeben. Unter diesen sind Pathogene, die versuchen ihren Wirt zu infizieren und auf unterschiedliche Weise Nährstoffe zu gewinnen. Pathogene Bakterien vermehren sich beispielsweise im Zellzwischenraum, nachdem sie über Wunden oder Stomata in Pflanzen eingedrungen sind (Jones und Dangl, 2006). Insekten stechen direkt in die Zellen des Wirts und Pilze verwenden unter anderem Haustorien für eine Infektion (Jones und Dangl, 2006). Um diese Angriffe abzuwehren wurden verschiedene Arten von Immunsystemen entwickelt. Ein Hauptkriterium dabei ist die Erkennung von Fremd- und Eigenen-Molekülen (Nürnberger *et al.*, 2004).

Im Folgendem wird jeweils die tierische und pflanzliche Immunabwehr, sowie deren Ähnlichkeiten dargelegt. Im Besonderen wird in der vorliegenden Arbeit eine Gemeinsamkeit der basalen Immunität zwischen Tieren und Pflanzen auf Transkriptionsebene beschrieben.

1.1.1. Das tierische Immunsystem

Das tierische Immunsystem kann in die angeborene und erworbene Immunität unterteilt werden. Das angeborene Immunsystem dient zur schnellen Abwehr von Pathogenen. Diese werden aufgrund ihrer konservierten *pathogen* bzw. *microbe associated molecular pattern* (PAMP/MAMP) durch *pattern recognition receptors* (PRR) von Immunzellen erkannt (Ausubel *et al.*, 2005). Nach Detektion des PAMPs wird in der Wirtszelle über eine Signalkaskade die Genexpression von Abwehrgenen aktiviert. Unter anderem werden Cytokine, Chemokine, Interferone und Defensine produziert, die zur Rekrutierung von Immunzellen und zur Abtötung der Pathogene benötigt werden (Delves und Roitt, 2000). Zu den verschiedenen Zelltypen des angeborenen Immunsystems gehören unter anderem Makrophagen, natürliche Killerzellen, neutrophile und dendritische Zellen. Makrophagen beseitigen durch Phagozytose veränderte und tote Zellen, sowie Zelltrümmer. Natürliche Killerzellen erkennen fremde Zellen und lösen durch cytotoxische Granula eine Apoptose in diesen aus. Neutrophile und dendritische Zellen gehören ebenfalls zu den phagocytischen Zellen. Wobei dendritische Zellen eine Schnittstelle zum erworbenen Immunsystem bilden, da diese T-Lymphocyten aktivieren (Delves und Roitt, 2000; Parkin und Cohen, 2001; Hoebe *et al.*, 2004).

Das adaptive bzw. erworbene Immunsystem besteht aus den antigenspezifischen Lymphocyten, die in B- und T-Lymphocyten unterteilt werden können. Nach Erkennung des Antigens durch B-Zellen differenzieren diese zu Plasmazellen, welche Antikörper produzieren. T-Zellen können nach Antigenkontakt in cytotoxische T-Zellen, die infizierte Zellen abtöten, T-Helferzellen, die B-Zellen bei der Aktivierung helfen, und regulatorische T-Zellen, die die Aktivität anderer Immunzellen steuern, differenzieren. Einige B- und T-Lymphocyten entwickeln sich für eine lang anhaltende Immunität zu Gedächtniszellen (Delves und Roitt, 2000; Parkin und Cohen, 2001; Hoebe *et al.*, 2004).

1.1.2. Der tierische Transkriptionsfaktor NF- κ B

Die *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) Familie hat eine zentrale Aufgabe in der angeborenen und erworbenen Immunität. Bei den NF- κ B Proteinen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die an der Regulierung von vielen verschiedenen Genen beteiligt sind, die z.B. antimikrobielle Peptide, Cytokine, Chemokine, Regulatoren der Stressabwehr und anti-apoptotische Proteine codieren (Li und Verma, 2002). Die tierische NF- κ B Familie besteht aus mehreren Mitgliedern, wie RELA (p65), NF- κ B1 (p50; p105), NF- κ B2 (p52; p100), c-REL und RELB. In Abbildung 1 sind die verschiedenen Mitglieder abgebildet. Am N-Terminus der verschiedenen Proteine befindet sich ein konservierter Bereich, der als *Rel-homology domain* (RHD) bezeichnet wird. In diesem befindet sich eine Dimerisierungsdomäne, ein Zellkernlokalisierungssignal und eine DNA-Bindedomäne. RELA (p65), c-REL und RELB haben am C-terminalen Ende eine Transaktivierungsdomäne zur Regulation der Genexpression (Gilmore, 2006). Diese Domäne fehlt in den Proteinen p50 und p52. p50 und p52 entstehen aus einer proteolytischen Spaltung aus p105 und p100. p105 und p100 tragen im C-terminalen Bereich *ankyrin repeats* (ANK), die für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich sind und das Protein inaktiv halten. Nach einer Aktivierung erfolgt eine proteolytische Spaltung an den Positionen 435 und 405, welche abhängig von einer Phosphorylierung am N-terminalen Ende und der *glycin-rich region* (GRR) ist (Li und Verma, 2002). Die NF- κ B Proteine sind in der aktiven Form Dimere. Die verschiedenen Proteine können Homo- und Heterodimere bilden. Dimere mit wenigstens einem NF- κ B Mitglied, das eine Transaktivierungsdomäne trägt, regulieren positiv die Genexpression (Baeuerle *et al.*, 1994). Homodimere aus p50 sollen die Transkription reprimieren (May und Ghosh, 1997). Das häufigste vorkommende NF- κ B Dimer besteht aus p65 und p50 (Ueberle *et al.*, 1993).

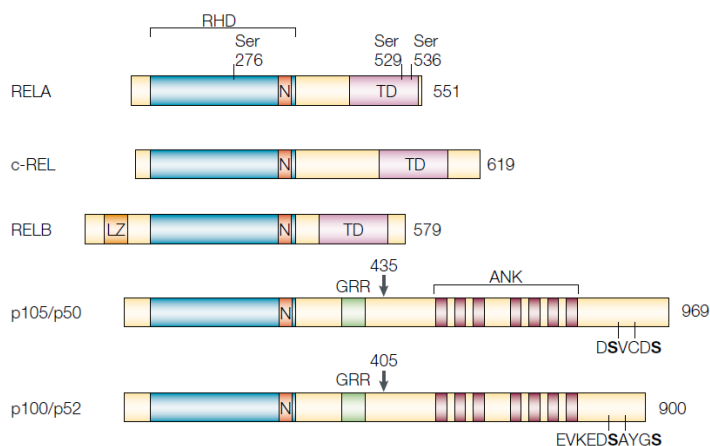


Abbildung 1: NF-κB Familienmitglieder (Li und Verma, 2002)

Die NF-κB Mitglieder RELA (p65), c-REL, RELB, p105/p50 (NF-κB1) und p100/p52 (NF-κB2) haben am N-terminalen Ende die konservierte RHD. Diese besteht aus einer Dimerisierungsdomäne, einem Zellkernlokalisierungssignal (N) und einer DNA-Bindedomäne. RELA, c-REL und RELB haben eine Transaktivierungsdomäne (TD). Die Proteine p105 und p100 haben ANKs, welche abhängig von der GRR und den Phosphorylierungsstellen proteolytisch an den Bereichen 435 bzw. 405 gespalten werden, wodurch p50 und p52 entstehen. Die Größen der verschiedenen Proteine sind in Aminosäuren angegeben.

In inaktiven Zellen befindet sich NF-κB im Cytoplasma assoziiert mit *inhibitor of NF-κB* (IκB) Proteinen. Diese besitzen ebenfalls ANK und maskieren das Zellkernlokalisierungssignal von NF-κB. Wird die NF-κB Signalkaskade aktiviert wird IκB durch einen IκB Kinase Komplex (IKK), bestehend aus IKK1, IKK2 und *NF-κB essential modulator* (NEMO), phosphoryliert und anschließend durch das Proteasom degradiert. NF-κB kann darauf in den Zellkern transportiert werden und die Genexpression der Zielgene regulieren. Die Aktivierung von NF-κB kann über viele unterschiedliche Signale erfolgen. In Abbildung 2 sind die verschiedenen Signalkaskaden zur Aktivierung von NF-κB dargestellt. Viele Pathogene werden über *Toll-like receptors* (TLRs) erkannt (Abbildung 2A), wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS) über TLR4. Die Erkennung von LPS über TLR4 mit CD14 und MD-2 führt zu einer Interaktion von TLR4 mit MYD88 und der Kinase IRAK. IRAK wiederum aktiviert den Kinasekomplex aus TAK1, TAB1 und TAB2. Dieser Komplex aktiviert den IKK-Komplex, der letztendlich IκB phosphoryliert. NF-κB kann aber auch durch Cytokine aktiviert werden (Abbildung 2B). Die Erkennung von *tumour-necroses factor* (TNF) erfolgt über den TNF Rezeptor TNFR1. Die Erkennung von TNF führt zur Trimerbildung von TNFR1, wodurch TRADD und TRAF2 rekrutiert werden. TRAF2 wiederum aktiviert die Kinasen RIP und MEKK3, die den IKK-Komplex aktivieren. NF-κB kann des Weiteren durch T-Zell Rezeptoren (TCR) in T-Zellen aktiviert werden (Abbildung 2C). In dieser Signalkaskade interagiert die Kinase PKCθ mit dem Proteinkomplex aus MAGUK, BCL-10 und MALT1, die wiederum den IKK-Komplex aktivieren. Der genaue Vorgang hierbei ist noch nicht genauer aufgeklärt (Grimm und Baeuerle, 1993; Li und Verma, 2002, Gilmore 2006).

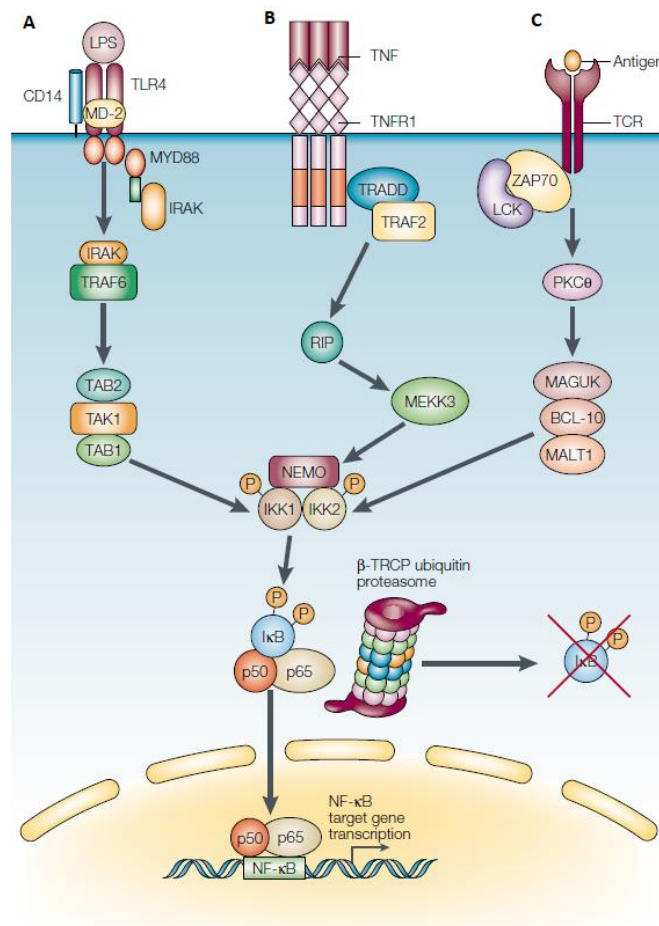


Abbildung 2: Aktivierung von NF-κB (Li und Verma, 2002)

NF-κB (p50/p65) wird über den Repressor IκB im Cytoplasma gehalten. Bei einer Erkennung von Pathogenen oder Stress- und Entzündungssignalen wird IκB durch einen IKK-Komplex phosphoryliert und durch das Proteasom degradiert. NF-κB kann darauf in den Zellkern transportiert werden und die Genexpression regulieren. Eine detaillierte Beschreibung befindet sich im Text.

1.1.3. Die pflanzliche Immunabwehr

Die pflanzliche Immunität und ein Infektionsverlauf in Pflanzenzellen können anhand des vier Stufen Modells von Bent und Mackey (2007) erklärt werden. Das Modell ist in Abbildung 3 dargestellt. In der ersten Phase werden die MAMPs bzw. PAMPs der Pathogene über PRRs erkannt (Abbildung 3A). Bei den PRRs handelt es sich um *receptor-like kinases* (RLKs), welche eine extrazelluläre, Transmembran- und Kinase-Domäne besitzen. Viele der RLKs, die am pflanzlichen Immunsystem beteiligt sind, tragen in ihrer extrazellulären Domäne *leucine-rich repeats* (LRR). Die Bindung eines Liganden durch einen PRR führt meist zu einer Dimerisierung mit einem Corezeptor und anschließender Signalweiterleitung über eine MAP-Kinase-Kaskade. Dies führt zu einer Veränderung der Genexpression, wodurch eine basale Immunantwort ausgelöst wird. Diese wird als *PAMP/MAMP-triggered immune response* (PTI/MTI) bezeichnet und verhindert das Wachstum des Pathogens (Jones und Dangl, 2006). Spezialisierte Pathogene können über Effektoren die PTI bzw. MTI inhibieren (Abbildung 3B). Dadurch wird der Wirt

anfällig für eine Infektion, das Wachstum des Pathogens wird ermöglicht und die Pflanze weist Krankheitssymptome auf. Diese Phase wird *effector-triggered susceptibility* (ETS) genannt. Zur Abwehr dieser spezialisierten Pathogene haben Pflanzen Resistenz (R)-Gene entwickelt (Abbildung 3C). Die R-Proteine können indirekt oder direkt Effektoren erkennen, wodurch eine stärkere *effector-triggered immunity* (ETI) ausgelöst wird. Nach Erkennung durch die R-Proteine werden die Effektoren als Avirulenzfaktoren bezeichnet. Durch die ETI ist die Pflanze resistent gegenüber dem Pathogen. Um wiederum einer ETI zu entgehen, können Pathogene die Effektoren modifizieren, sodass diese nicht mehr durch R-Proteine erkannt werden (Abbildung 3D). Die Pflanze ist damit wieder anfällig für eine Infektion (Bent und Mackey, 2007).

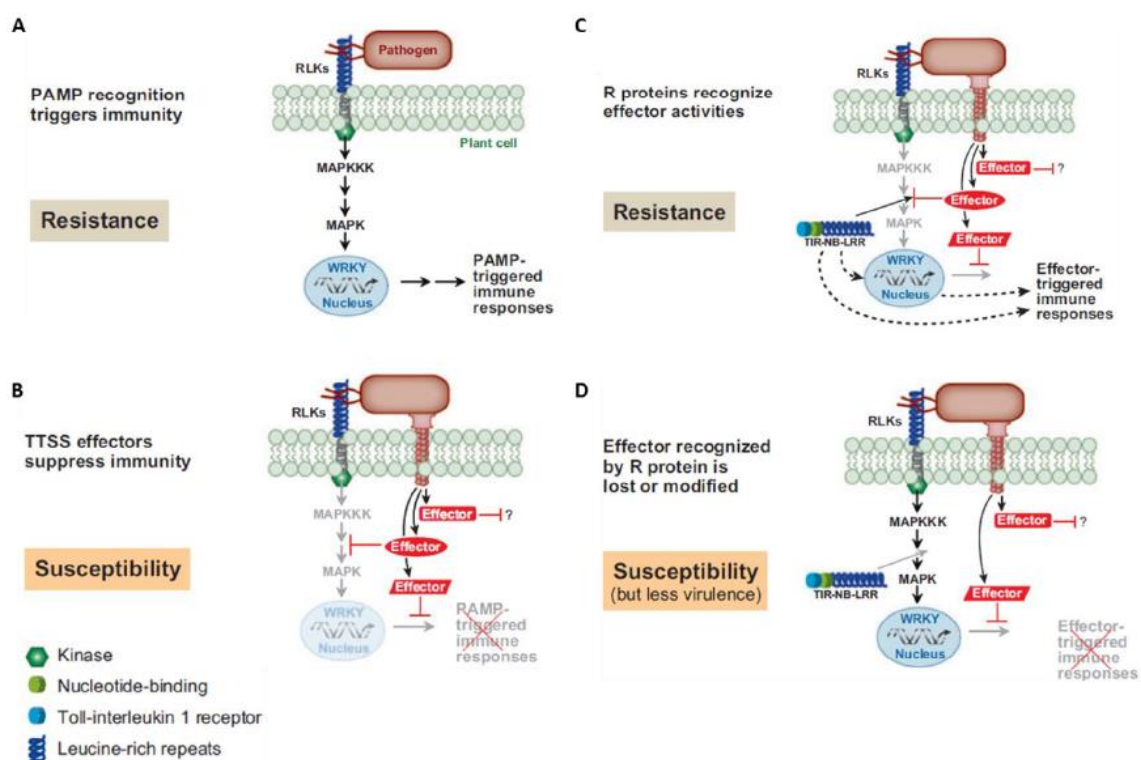


Abbildung 3: Vier Stufenmodell der Pflanzen-Pathogen-Interaktion (Bent und Mackes, 2007)

A: Pathogene werden durch PAMPs von RLKs der pflanzlichen Zelle erkannt. Dies führt zu einer Aktivierung einer MAP-Kinase-Kaskade, Veränderung der Genexpression und einer PTI. B: Effektoren können auf verschiedene Arten die Aktivierung der PTI blockieren. C: R-Proteine erkennen die Effektoren, wodurch eine ETI von der Pflanze ausgelöst wird. D: Durch Modifikation der Effektoren können R-Proteine diese nicht mehr erkennen.

Die ETI ist im Gegensatz zur PTI häufig mit einer hypersensitiven Reaktion mit programmiertem Zelltod verbunden (Jones und Dangl, 2006). Sowohl in der PTI als auch in der ETI entwickelt die Pflanze eine Resistenz gegenüber dem Pathogen, aufgrund dessen wird das pflanzliche Immunsystem bestehend aus PTI und ETI auch vereinfacht als Erkennung von Pathogenen mit entsprechender Abwehrreaktion beschrieben (Thomma *et al.*, 2011). Die Erkennung eines Pathogens durch die infizierte Pflanze kann in neun verschiedene Mechanismen eingeteilt werden (Kourelis und van der Hoorn, 2018). In Abbildung 4 sind die unterschiedlichen Mechanismen grafisch dargestellt. Dabei wird die Erkennung

des Pathogens in eine direkte und indirekte Erkennung durch PRRs in der Zellmembran (Mechanismus 1 – 2), eine intrazelluläre Erkennung (Mechanismus 3 – 6) und in den Verlust der Anfälligkeit gegenüber des Pathogens eingeteilt (Mechanismus 7 – 9). Die intrazelluläre Erkennung kann direkt oder indirekt über *Nod-like receptors* (NLRs) erfolgen, sowie durch zusätzliche Domänen in den NLR Rezeptoren (Mechanismus 3 – 5). Bei den NLRs handelt es sich um verschiedene R-Proteine, wie beispielsweise L5, L6 und L7 aus Flachs, die den Avirulenzfaktor AvrL567 aus *Melampsora lini* erkennen (Dodds *et al.*, 2004; Dodds *et al.*, 2006). Die intrazelluläre Erkennung des Pathogens kann desweiteren durch die Expression von *executor genes* stattfinden (Mechanismus 6) (Kourelis und van der Hoorn, 2018). Hierbei wird direkt die Expression von R-Genen durch die Effektoren induziert. Der Verlust der Anfälligkeit der infizierten Pflanzen gegenüber dem Pathogen kann entweder aktiv (Mechanismus 7), indem gegen die Aktivität des Effektors gearbeitet wird, passiv (Mechanismus 8), in dem die pflanzliche Interaktionsstelle des Effektors modifiziert wird, oder durch Veränderung des Expressionsmusters der Wirtspflanze erfolgen (Mechanismus 9) (Kourelis und van der Hoorn, 2018). Der Ausgang einer Pflanzen-Pathogen-Interaktion wird letztlich durch eine bessere Anpassung an den Wirt bzw. Pathogen entschieden (Bent und Mackey, 2007).

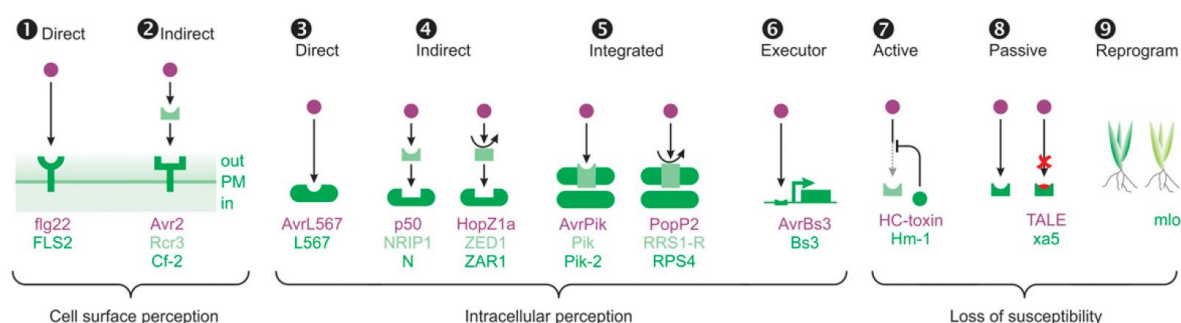


Abbildung 4: Neun verschiedene pflanzliche Mechanismen zur Erkennung von PAMPs und Effektoren (Kourelis und van der Hoorn, 2018)

Dargestellt sind die direkte (1) und indirekte (2) Erkennung durch PRRs in der Zellmembran, vier intrazelluläre Erkennungsmechanismen (3 – 6) und drei Mechanismen zum Verlust der Pathogenanfälligkeit (7 – 9). PAMPs und Effektoren sind lila, die Rezeptoren für eine direkte Erkennung in dunkelgrün und für eine indirekte Erkennung in hellgrün.

1.1.4. Vergleich tierischer und pflanzlicher Immunität

Das angeborene Immunsystem von Tieren und die pflanzliche Immunabwehr weisen starke Ähnlichkeiten auf. Generell werden MAMPs über PRRs, wie die Toll-like Rezeptoren (TLR) in tierischen und RLKs in pflanzlichen Zellen, erkannt (Ausubel, 2005). Die Erkennung durch die PRRs erfolgt jeweils über LRR Domänen. In Abbildung 5 ist die Erkennung des bakteriellen Elicitor Flagellin 22 (flg22) und die anschließende Signalkaskade grafisch dargestellt. Studien der PRRs, die flg22 detektieren, zeigen, dass der tierische TLR5 und pflanzliche FLS2 unterschiedliche Bereiche des MAMPs erkennen (Zipfel

und Felix, 2005). Nach Detektion eines Pathogens durch die PRRs erfolgt eine Signalweiterleitung innerhalb der Zellen über MAP-Kinase-Kaskaden. Diese ist in Tieren und Pflanzen strukturell und funktionell ähnlich (Nürnberger *et al.*, 2004, Ausubel, 2005).

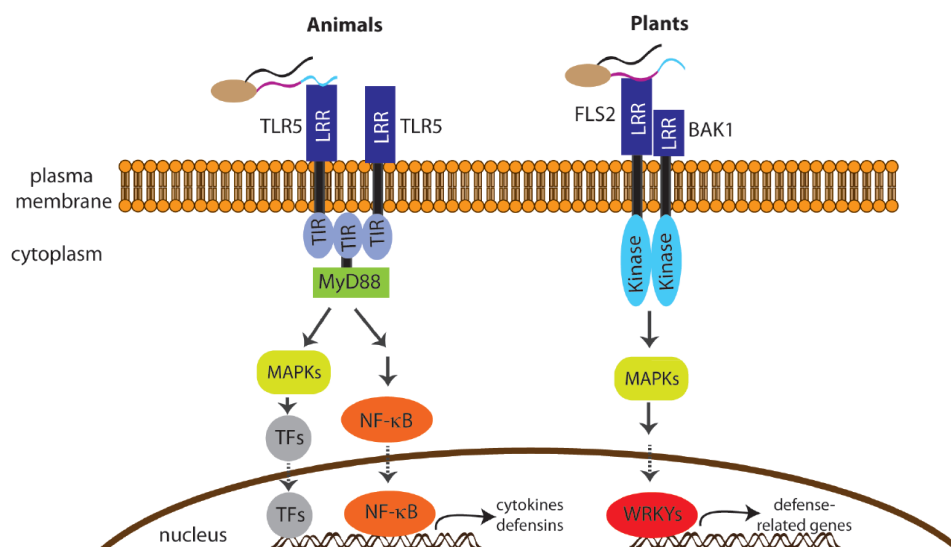


Abbildung 5: Erkennung des bakteriellen Flagellins und Signalweiterleitung in tierischen und pflanzlichen Zellen (Haney *et al.*, 2014)

Das bakterielle Flagellin wird in tierischen Zellen durch TLR5 und in pflanzlichen Zellen durch FLS2 erkannt. Nach Signalweiterleitung in der Zelle werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, die die Abwehrgene regulieren.

Neben der extrazellulären Detektion von Pathogenen können MAMPs auch intrazellulär wahrgenommen werden (Duxbury *et al.*, 2016). Zur Abwehr haben pflanzliche und tierische Zellen intrazelluläre Rezeptoren entwickelt. Die Erkennung erfolgt über NLRs. Obwohl es viele verschiedene NLRs gibt, scheint der Erkennungsmechanismus in den verschiedenen Arten ähnlich zu sein (Duxbury *et al.*, 2016). Trotz der genannten Ähnlichkeiten wird angenommen, dass sich die pflanzliche und tierische Immunität konvergent entwickelt haben (Ausubel, 2005). Zur Signalweiterleitung nach Erkennung von PRRs haben die tierischen TLRs eine intrazelluläre *Toll-like interleukin-1 receptor* (TIR) Domäne entwickelt. Die TIR Domäne findet sich auch in den pflanzlichen NLRs (Ausubel, 2005). NLRs in tierischen und pflanzlichen Zellen haben sich wahrscheinlich aus der prokaryotischen Andenosintriphosphatase, dem Vorgänger der *nucleotide binding domain*, entwickelt (Jones und Dangl, 2016). Die LRR Domäne wird zum Zeitpunkt der Trennung von Prokaryoten und Eukaryoten datiert und ist in NLRs von pflanzlichen und tierischen Zellen vorhanden (Yue *et al.*, 2012).

Während die PRRs, NLRs und MAP-Kinasen strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, haben Pflanzen und Tiere unterschiedliche Transkriptionsfaktorfamilien zur Regulation von Abwehrgenen entwickelt. In tierischen Zellen hat NF-κB eine Schlüsselrolle in der Regulation, während WRKY in Pflanzen die Transkription regulieren. WRKY Faktoren gehören zu einer der größten Familien von

Transkriptionsfaktoren in Pflanzen, die in Tieren nicht vorkommen (Rushton *et al.*, 2010). Sie regulieren sowohl positiv als auch negativ die Expression von Genen, die unter anderem in der PTI und ETI beteiligt sind. Die NF- κ B Transkriptionsfaktoren sind in Pflanzen nicht vorhanden (Ausubel, 2005), interessanterweise zeigt aber ein *cis*-Element aus dem *pathogenesis related* Gen *PR1* aus *A. thaliana* eine Ähnlichkeit zur NF- κ B Bindungsstelle (Lebel *et al.*, 1998). Weitere Untersuchungen zur Ähnlichkeit bzw. Verwandtschaft im tierischen und pflanzlichen Immunsystem auf Transkriptionsebene wurden bisher nicht durchgeführt.

1.2. Identifizierung von Pathogen-responsiven *cis*-regulatorischen Sequenzen mittels bioinformatischer und experimenteller Analysen

Zur Identifizierung von neuen Pathogen-responsiven *cis*-Sequenzen haben Koschmann *et al.* (2012) eine Kombination aus bioinformatischen und experimentellen Analysen durchgeführt. Die Genexpression wird durch eine Vielzahl an unterschiedlichen *cis*-Elementen im Promotor reguliert. Die Grundidee der Analyse von Koschmann *et al.* (2012) basiert auf der Annahme, dass koregulierte Gene ein ähnliches Set an *cis*-Sequenzen in ihrem Promotor aufweisen und über gleiche Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Im ersten Schritt der Analyse wurden Daten von Microarray-Experimenten aus der PathoPlant Datenbank (Bülow *et al.*, 2007) verwendet. Es wurden 510 Gengruppen identifiziert, die mindestens um den Faktor 2 bei einer Behandlung von einem bis zu sechs verschiedenen pilzlichen Stimuli hochreguliert wurden. Von diesen hochregulierten Genen wurden die Promotoren weiter analysiert. Durch das Software-Paket BEST (Che *et al.*, 2005) wurde der Bereich 1000 bp upstream des Transkriptionsstarts auf konservierte Bereiche untersucht. Insgesamt wurden in den untersuchten Promotoren 407 verschiedene Sequenzmotive identifiziert. Jedes Sequenzmotiv besteht aus mehreren Einzelsequenzen mit einer ähnlichen Kernsequenz. Durch das online Tool STAMP (Mahony und Benos, 2007) wurde die Verwandtschaft der identifizierten Motive untersucht, sowie Ähnlichkeiten zu bereits entdeckten Transkriptionsfaktorbindestellen analysiert. Die Ähnlichkeit der Motive wurde durch die Software MEGA, die Teil von STAMP ist, als Stammbaum grafisch dargestellt. Durch diese Analysen wurden insgesamt 37 Motivgruppen bestimmt. Wie erwartet haben manche der Motive Ähnlichkeiten zu Transkriptionsfaktorbindungsstellen von ERF, bZIP und WRKY, die einen großen Einfluss auf die Regulation der pflanzlichen Immunität haben. Interessanterweise konnte bei den meisten neu identifizierten Motiven jedoch keine bereits beschriebene Ähnlichkeit entdeckt werden. In Abbildung 6 ist die beschriebene bioinformatische und experimentelle Analyse grafisch dargestellt.

Zur Analyse auf Funktionalität der bioinformatisch identifizierten *cis*-Sequenzen wurde das Petersilienprotoplastensystem (Hahlbrock *et al.*, 1995; Kanofsky *et al.*, 2016) verwendet. Die zu untersuchenden *cis*-Sequenzen wurden als Tetramer upstream eines Minimalpromotors und eines β -Glucuronidase (GUS) Reportergens kloniert. Zur Normierung enthält der verwendete Vektor ein konstitutiv exprimiertes Luciferase (LUC) Gen. Die erstellten Reportergenkonstrukte wurden in Petersilienprotoplasten transformiert und zur Analyse auf MAMP-Responsivität mit dem Elicitor Pep25 aus *Phytophthora sojae* behandelt. Von 76 untersuchten *cis*-Elementen zeigten 25 eine Pep25-Responsivität (Koschmann *et al.*, 2012).

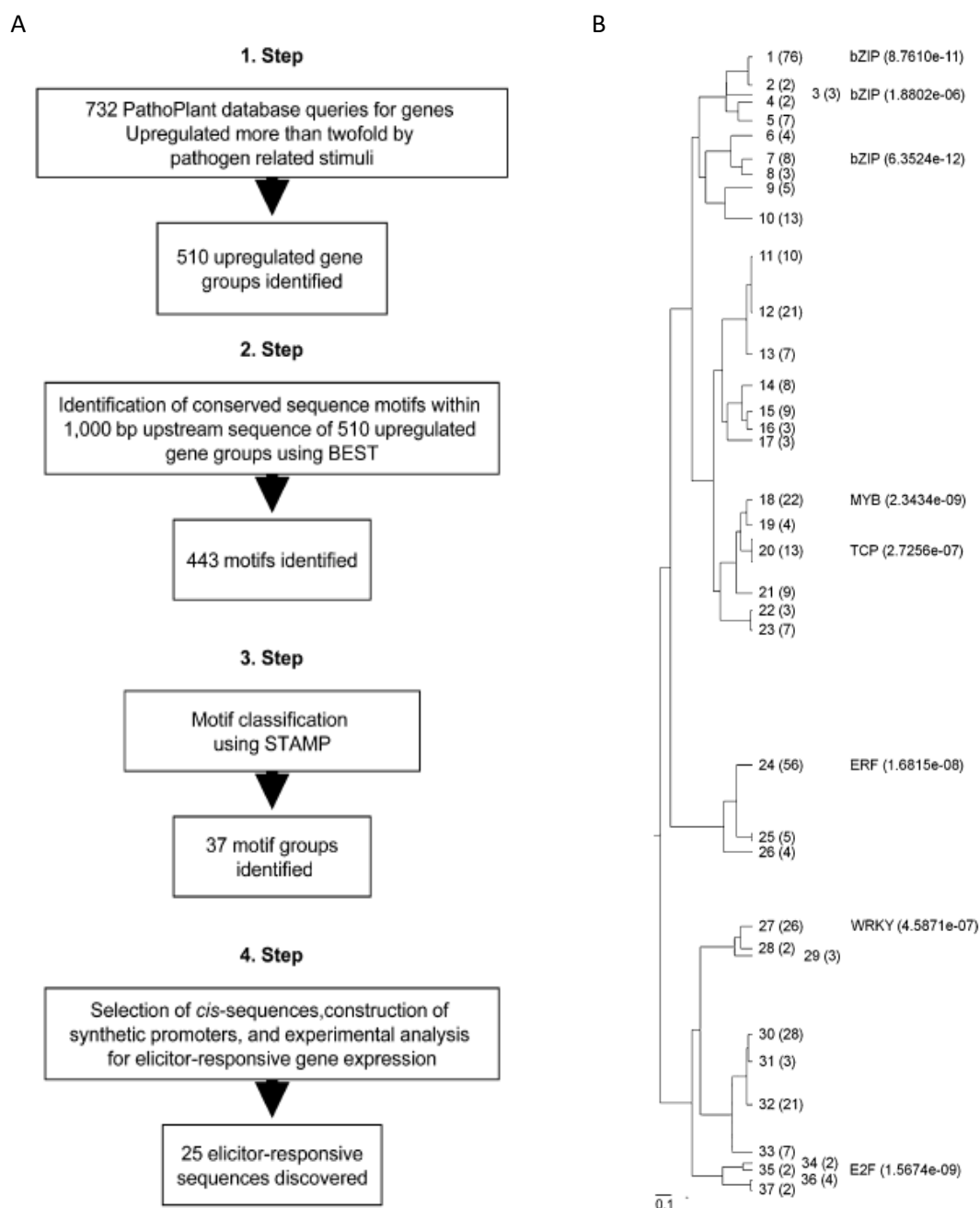


Abbildung 6: Bioinformatische und experimentelle Analyse zur Identifizierung von neuen Pathogen-responsiven *cis*-regulatorischen Sequenzen (Koschmann *et al.*, 2012)

A: Vier bioinformatische und experimentelle Schritte zur Identifizierung Pathogen-responsiver *cis*-Sequenzen. B: Gruppierung der verschiedenen Motivgruppen basierend auf ihrer Ähnlichkeit zueinander. In Klammern ist die Anzahl der Motive pro Gruppe aufgeführt. Ähnlichkeiten zu bereits beschriebenen Transkriptionsfaktorbindestellen sind angegeben.

1.3. Die WT-Box als neue Elicitor-responsive *cis*-regulatorische Sequenz

Die *cis*-Sequenzen der Motivgruppe 27 tragen das konservierte Kernmotiv GACTTT, welches als WT-Box bezeichnet wird (Koschmann *et al.*, 2012, Machens *et al.*, 2014). In Abbildung 7 sind die Reporterogenaktivitäten der positiv getesteten Pep25-responsiven *cis*-Sequenzen und die entsprechenden Sequenzen, sowie das *family binding profile* aller Sequenzen der Motivgruppe 27 aufgeführt (Koschmann *et al.*, 2012). Alle *cis*-Sequenzen zeigen eine gesteigerte GUS-Reporterogenaktivität nach Elicitor-Behandlung (Abbildung 7A). In Abbildung 7B ist ein Alignment dieser Sequenzen gezeigt (die WT-Box ist grau hinterlegt). Die WT-Box weist Ähnlichkeiten zur WRKY Bindungsstelle (W-Box) auf. Die W-Box hat die Kernsequenz TTGAC(C/T) (Rushton *et al.*, 2010) und findet sich im von STAMP erstellten family binding profile der Motivgruppe 27 wieder (Abbildung 7C). Drei Sequenzen (S21, S22 und S24) haben neben dem Kernmotiv der Gruppe 27 noch jeweils zwei W-Boxen (unterstrichen), wobei bei S21 und S22 diese in der WT-Box liegen. Interessanterweise haben nicht alle Sequenzen der Motivgruppe 27 eine W-Box im konservierten Kernmotiv. Die Sequenz 15 trägt zwei WT-Boxen und eine GCC-Box (unterstrichen) und weist eine starke Reporterogenaktivität auf (Koschmann *et al.*, 2012). Die Sequenzen 18, 20 und 23 weisen kein weiteres *cis*-Element neben der WT-Box Kernsequenz auf.

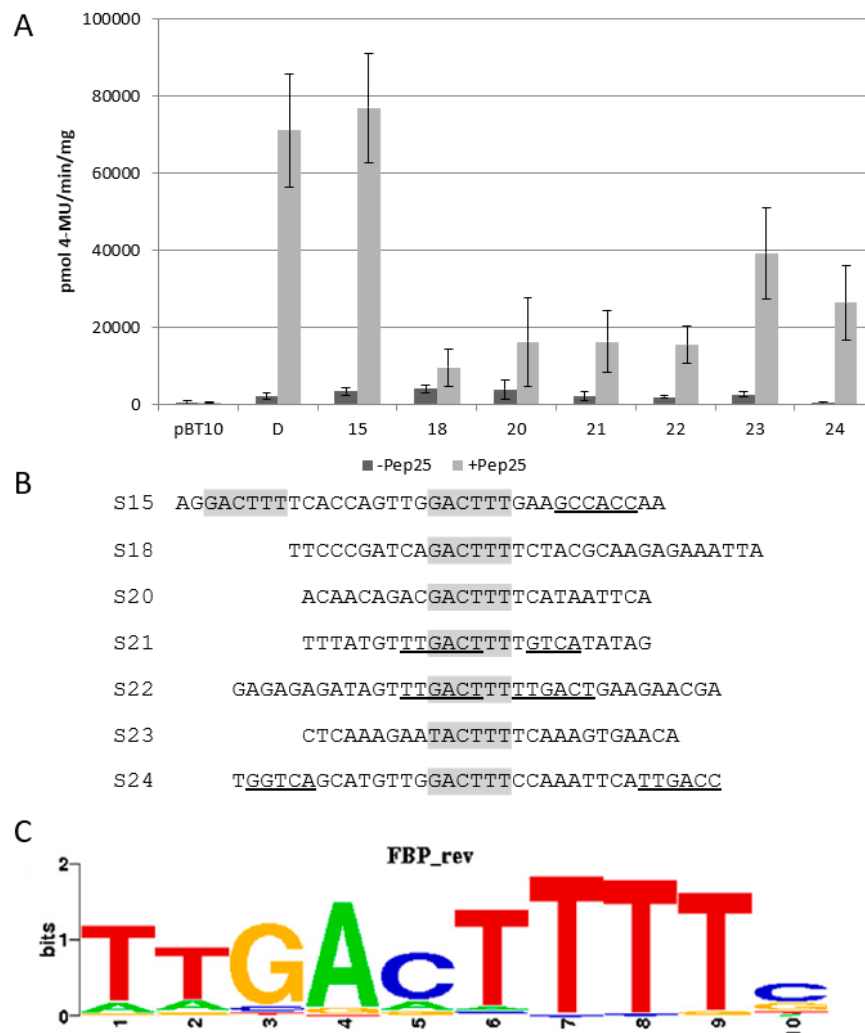


Abbildung 7: Elicitor-responsive *cis*-regulatorische Sequenzen der Motivgruppe 27 (nach Koschmann *et al.*, 2012)

A: Ergebnisse des GUS-Assays unter Verwendung des Petersilienprotoplastensystems. pBT10GUS-d35SLUC (pBT10) dient als negativ Kontrolle, während das Tetramer des D-Elements (D) als positiv Kontrolle verwendet wird. Sieben verschiedene Pep25-responsive *cis*-Sequenzen der Motivgruppe 27 sind gezeigt. B: Alignment der Pep25-responsiven *cis*-Elemente. Im grauen Kästchen befindet sich das Kernmotiv, die WT-Box. Unterstrichen sind W-Boxen und die GCC-Box aus S15. C: *Family binding profile* der Motivgruppe 27.

Durch verschiedene Mutationen in den Sequenzen 15, 20, 23 und 24 konnte gezeigt werden, dass die WT-Box und benachbarte Nukleotide für die Pep25-Responsivität verantwortlich sind (Machens *et al.*, 2014, Lehmeier *et al.*, 2016, Kanofsky *et al.*, 2017). Interessanterweise weist Sequenz 15 eine Elicitor-Responsivität nur in Abhängigkeit beider WT-Boxen und der GCC-Box auf (Lehmeier *et al.*, 2016). Durch Yeast One-Hybrid Screens mit der *A. thaliana* Transkriptionsfaktor *only-library* (Mitsuda *et al.*, 2010) wurde WRKY70 als Interaktionspartner der Sequenz 20 identifiziert (Machens *et al.*, 2014). Weitere Analysen im Petersilienprotoplastensystem zeigen die Sequenz YGACTTTT als regulatorischen Bereich von WRKY70. Für die WT-Boxen GGACTTTT und GGACTTTG aus Sequenz 15 konnte durch Yeast One-Hybrid Screens hingegen kein Transkriptionsfaktor als Interaktionspartner mit der WT-Box identifiziert werden (Lehmeier *et al.*, 2016). Durch Yeast One-Hybrid Screens mit S24 wurden WRKY26, 40, 41 und 70 als Bindungspartner ermittelt (Kanofsky *et al.*, 2017). WRKY40 und 70 binden an die W-

Boxen in S24, WRKY26 und 41 benötigen hingegen eine Kombination aus WT- und W-Boxen zur Aktivierung der Reportergenaktivität in Hefezellen. Aufgrund der Ergebnisse in Yeast One-Hybrid Screens wurde eine Einteilung der WT-Boxen in zwei verschiedene Typen vorgenommen. Typ I WT-Boxen mit der Sequenz YGACTTT sind WRKY-Bindestellen und für die Typ II WT-Box mit GGACTTT konnte noch kein bindendes Protein eindeutig zugeordnet werden. Die WT-Box AGACTTTT aus der *cis*-Sequenz 18 ist bisher nicht eingeteilt. In Tabelle 1 ist die Einteilung der WT-Boxen nochmal aufgeführt.

Tabelle 1: Zwei verschiedene Typen von WT-Boxen

| <i>cis</i> -Sequenz | WT-Box | Typ | Transkriptionsfaktor | Quelle |
|---------------------|----------|-----|----------------------|-------------------------------|
| S20 | CGACTTTT | I | WRKY70 | Machens <i>et al.</i> , 2014 |
| S20mut14 S22 | TGACTTTT | I | WRKY70 | Machens <i>et al.</i> , 2014 |
| S15 | GGACTTTT | II | n.b. | Lehmeyer <i>et al.</i> , 2016 |
| S15 | GGACTTTG | II | n.b. | Lehmeyer <i>et al.</i> , 2016 |
| S24 | GGACTTTC | ? | n.b. | Kanofsky <i>et al.</i> , 2017 |
| S18 | AGACTTTT | ? | n.b. | |

Durch die bisherigen Untersuchungen konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, welche Transkriptionsfaktoren an die verschiedenen WT-Boxen binden. Weitere Analysen werden zur Klärung benötigt, ob es sich bei der WT-Box um eine generelle WRKY-Bindungsstelle handelt, oder ob die WT-Box in verschiedene Typen mit verschiedenen Bindungspartnern unterteilt werden kann.

2. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollen Typ II WT-Box-bindende Proteine identifiziert und analysiert werden. Zur Identifizierung dieser Proteine soll eine bioinformatische Analyse mit der footprintDB (<http://floresta.eead.csic.es/footprintdb/>) Datenbank mit den verschiedenen Typ II WT-Boxen aus Sequenz 15 (GGACTTTT und GGACTTTG) und 24 (GGACTTTC) vorgenommen werden. Hierbei sollen mögliche Bindungsproteine neben *Arabidopsis thaliana* auch von anderen Organismen bestimmt werden. Durch eine Identifizierung von WT-Box-bindenden Proteinen aus anderen Organismen könnten über Homologie oder Ähnlichkeiten in der DNA-Bindedomäne mögliche Faktoren in *Arabidopsis thaliana* entdeckt werden. Die potentiellen WT-Box-bindenden Proteine sollen im Petersilienprotoplastensystem auf ihre Regulation der Reportergenexpression hin untersucht und der Einfluss der WT-Boxen bestimmt werden.

Die WRKY Faktoren 26, 40 und 41 wurden in Yeast One-Hybrid Screens als Interaktionspartner der Sequenz 24 identifiziert (Kanofsky *et al.*, 2017). Die verschiedenen Transkriptionsfaktoren sollen im Petersilienprotoplastensystem bezüglich ihrer Regulation der Reportergenaktivität untersucht werden. Aktivieren oder reprimieren die verschiedenen WRKYs die Reportergenexpression? WRKY26 und 41 benötigen in Hefezellen eine Kombination der WT- und W-Boxen zur Regulation der *HIS3*-Expression (Kanofsky *et al.*, 2017). Die Kombination der WT- und W-Boxen zur S24-vermittelten Reportergenaktivität durch WRKY26 und 41 soll im Petersilienprotoplastensystem näher untersucht werden.

Sequenz 18 ist die einzige von Koschmann *et al.* (2012) getestete Pep25-responsive Sequenz, die vor dem Kernmotiv der WT-Box ein Adenin aufweist (AGACTTTT). Aufgrund dessen soll der Elicitor-responsive Bereich in Sequenz 18 weiter eingegrenzt werden. Durch Yeast One-Hybrid Screens mit der Transkriptionsfaktor *only-library* (Mitsuda *et al.*, 2010) sollen mögliche Interaktionspartner identifiziert werden.

Die verschiedenen aus *Arabidopsis thaliana* stammenden WT-Box beinhaltenden *cis*-Elemente wurden bisher nur auf Pep25-Responsivität im heterologen Petersilienprotoplastensystem getestet (Koschmann *et al.*, 2012; Machens *et al.*, 2014, Lehmeyer *et al.*, 2016, Kanofsky *et al.*, 2017). Die MAMP-Responsivität der Sequenzen 15, 18 und 24 soll im homologen *Arabidopsis thaliana*-Protoplastensystem getestet werden.

Diese Ergebnisse sollen aufklären, welchen Einfluss die WT-Box bei der Transkription von MAMP-responsiven Genen hat und ob es sich bei der WT-Box um ein konserviertes *cis*-Element handelt. Desweiteren könnte bei einer Identifizierung verschiedener WT-Box-bindender Proteine aus unterschiedlichen Organismen ein evolutionärer Zusammenhang aufgezeigt werden.

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland) und Applichem (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Bei weniger gebräuchlichen Chemikalien wird der Hersteller angegeben.

Die in molekularen Arbeiten verwendeten DNA-modifizierenden Enzyme sowie Restriktionsenzyme wurden von Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA) bezogen.

3.2. Lösungen und Medien

Sofern nicht anders angegeben wurden alle Lösungen mit ddH₂O angesetzt.

3.2.1. Antibiotika und Herbizide

Antibiotika und Herbizide wurden als konzentrierte Stammlösungen eingesetzt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei – 20 °C gelagert.

Carbenicillin-Stammlösung

100 mg/mL Carbenicillin-Dinatriumsalz

Arbeitskonzentration zur Selektion von Bakterien: 50 mg/L

Chloramphenicol-Stammlösung

100 mg/mL Chloramphenicol

In Ethanol lösen; Arbeitskonzentration zur Selektion von Bakterien: 50 mg/L

Kanamycin-Stammlösung

100 mg/mL Kanamycinsulfat

Arbeitskonzentration zur Selektion von Bakterien: 50 mg/L

Arbeitskonzentration zur Selektion von A. thaliana: 38 mg/L

Rifampicin-Stammlösung

50 mg/mL Rifampicin

In DMSO lösen; Arbeitskonzentration zur Selektion von Bakterien: 50 mg/L

Tetracyclin-Stammlösung

12,5 mg/mL Tetracyclin-Hydrochlorid

In Ethanol lösen; Arbeitskonzentration zur Selektion von Bakterien: 12,5 mg/L

Phosphinotricin (PPT)-Stammlösung

15 mg/mL DL-Phosphinotricin

Arbeitskonzentration zur Selektion von A. thaliana: 30 mg/L

3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT)-Stammlösung

1 M 3-Amino-1,2,4-triazole

In ddH₂O lösen, sterilfiltrieren und bei 4 °C bis zu einem Monat verwendbar.

Die Arbeitskonzentrationen wurden für jeden Hefestamm separat getestet und betrugen 50 – 100 mM 3-AT.

3.2.2. Hormone

β-Estradiol

10 mM β-Estradiol

In Ethanol lösen; Lagerung bei – 20 °C

3.2.3. Nährmedien

Die verschiedenen Medien wurden durch Autoklavieren (20 min, 121 °C) sterilisiert. Temperaturempfindliche Komponenten (z.B. Antibiotika, Glucose etc.) wurden sterilfiltriert und dem Medium nachträglich zugegeben.

3.2.3.1. Nährmedien zur Kultivierung von Bakterien

LB-Medium

10 g/L Bacto-Trypton

5 g/L Hefe-Extrakt

10 g/L NaCl

15 g/L Agar (bei Festmedien)

dYT-Medium

16 g/L Bacto-Trypton

| | |
|--------|--------------|
| 10 g/L | Hefe-Extrakt |
| 5 g/L | NaCl |

SOC-Medium

| | |
|-----------|--------------------------------------|
| 20 g/L | Bacto-Trypton |
| 5 g/L | Hefe-Extrakt |
| 584 mg/L | NaCl |
| 186 mg/L | KCl |
| 2,033 g/L | MgCl ₂ ·6H ₂ O |
| 2,465 g/L | MgSO ₄ ·7H ₂ O |

Der pH-Werte sollte zwischen 6,8 – 7,0 liegen, mit ddH₂O auf 990 mL auffüllen, autoklavieren und anschließend Zugabe von

| | |
|-------|-------------------------------|
| 10 mL | 2 M Glucose (sterilfiltriert) |
|-------|-------------------------------|

Aliquotieren, Lagerung bei – 20 °C.

3.2.3.2. Nährmedien zur Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

2x YPAD-Medium

| | |
|---------|-----------------------|
| 20 g/L | Hefe-Extrakt |
| 40 g/L | Pepton |
| 80 mg/L | L-Adenin Hemisulfat |
| 18 g/L | Agar (bei Festmedien) |

Zugabe von 900 mL ddH₂O, autoklavieren und anschließend Zugabe von

| | |
|--------|--------------------------------|
| 100 mL | 40 % Glucose (sterilfiltriert) |
|--------|--------------------------------|

10x Aminosäure-Lösung (Drop-Out-Mix)

Zur Selektion von spezifischen Hefestämmen wurden entsprechende Aminosäuren in dem aufgeführten Mix weggelassen.

| | |
|-----------|---------------------------|
| 200 mg/L | L-Adenin-Hemisulfat |
| 200 mg/L | L-Arginin-HCl |
| 200 mg/L | L-Histidin-HCl Monohydrat |
| 300 mg/L | L-Isoleucin |
| 1000 mg/L | L-Leucin |
| 300 mg/L | L-Lysin-HCl |
| 200 mg/L | L-Methionin |
| 500 mg/L | L-Phenylalanin |

| | |
|-----------|--------------|
| 2000 mg/L | L-Threonin |
| 200 mg/L | L-Tryptophan |
| 300 mg/L | L-Tyrosin |
| 200 mg/L | L-Uracil |
| 1500 mg/L | L-Valin |

Nach dem Autoklavieren wurde die Lösung bei 4 °C gelagert.

SD-Medium

| | |
|---------|---|
| 6,7 g/L | Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (BD, Franklin Lakes, USA) |
| 100 mL | 10x Aminosäure-Stammlösung mit benötigter Zusammensetzung |
| 18 g/L | Agar (bei Festmedien) |

Auffüllen auf 950 mL mit ddH₂O und pH 5,6 mit NaOH einstellen. Nach dem Autoklavieren Zugabe von:

| | |
|-------|--------------------------------|
| 50 mL | 40 % Glucose (sterilfiltriert) |
|-------|--------------------------------|

Lagerung bei 4 °C.

3.2.3.3. Nährmedien zur Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

½ MS-Medium

| | |
|----------|--|
| 2,45 g/L | Murashige & Skoog Medium (Duchefa, Haarlem, Niederlande) |
| 8 g/L | Agar (bei Festmedien) |

pH 6,0 mit KOH einstellen, autoklavieren.

3.2.3.4. Nährmedien zur Kultivierung von *Petroselinum crispum*

Fe-EDTA Lösung (500 mL)

| | |
|---------|--------------------------------------|
| 2,78 mg | FeSO ₄ ·7H ₂ O |
| 3,73 mg | Na ₂ EDTA |

Nicht autoklavieren, Lagerung bei 4 °C.

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) Lösung (500 mL)

| | |
|-------|-------|
| 50 mg | 2,4-D |
|-------|-------|

2,4-D in einem kleinen Volumen (ca. 1 mL) 100 % Ethanol lösen, dann mit ddH₂O auffüllen. Lagerung bei 4 °C.

Spurenelemente (100 mL)

| | |
|---------|-------------------------------------|
| 300 mg | H ₃ BO ₃ |
| 1,12 mg | MnSO ₄ ·H ₂ O |

| | |
|--------|---------------------------------------|
| 300 mg | ZnSO ₄ ·7H ₂ O |
| 25 mg | NaMoO ₄ ·2H ₂ O |
| 39 mg | CuSO ₄ ·5H ₂ O |
| 25 mg | CoCl ₂ ·6H ₂ O |

Auf 100 mL mit ddH₂O auffüllen, sterilfiltrieren und in Aliquots lagern.

B5-Vitamine (500 mL)

| | |
|--------|---------------|
| 5 g | Myo-Inositol |
| 50 mg | Nikotinsäure |
| 50 mg | Pyridoxin-HCl |
| 500 mg | Thiamin-HCl |

Auf 500 mL mit ddH₂O auffüllen, sterilfiltrieren und in Aliquots bei – 20 °C lagern.

HA-Medium (1 L)

| | |
|---------|--|
| 20 mL | aus 1,236 M KNO ₃ Stammlösung |
| 1,14 mL | aus 0,582 M CaCl ₂ ·2H ₂ O Stammlösung |
| 2 mL | aus 0,507 M MgSO ₄ ·7H ₂ O Stammlösung |
| 2 mL | aus 0,507 M (NH ₄) ₂ SO ₄ Stammlösung |
| 2 mL | aus 0,543 M NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O Stammlösung |
| 1 mL | aus 2,25 mM KI Stammlösung |
| 2,5 mL | aus Fe-EDTA Stammlösung (s.o.) |
| 1 mL | aus Spurenelemente Stammlösung (s. o.) |
| 10 mL | aus B5-Vitamine Stammlösung (s. o.) |
| 10 mL | aus 2,4-D Stammlösung (s. o.) |
| 20 g | Saccharose |

Mit ddH₂O auf ca. 700 mL auffüllen, pH 5,5 mit KOH/HCl einstellen. Auf 1 L mit ddH₂O auffüllen. In 40 mL Portionen in 200 mL Erlenmeyer-Kolben autoklavieren. Sofort nach der Sterilisation aus dem Autoklaven nehmen, auf Raumtemperatur abkühlen lassen und dunkel lagern.

3.2.4. DNA- und Gelelektrophoreselösungen

TE

| | |
|-------|--------------------------------------|
| 10 mM | TRIS-HCl aus 1 M Stammlösung, pH 8,0 |
| 1 mM | EDTA aus 0,5 M Stammlösung, pH 8,0 |

LTE

| | |
|-------|--------------------------------------|
| 10 mM | TRIS-HCl aus 1 M Stammlösung, pH 8,0 |
|-------|--------------------------------------|

0,1 mM EDTA aus 0,5 M Stammlösung, pH 8,0

50x TAE

2 M TRIS

1 M Essigsäure

50 mM EDTA aus 0,5 M Stammlösung, pH 8,0

10x DNA-Ladepuffer

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

0,25 % (w/v) Xylen-Cyanol

25 % (v/v) Ficoll-400

3.2.5. Lösungen zur Sterilisation und Aussaat von *Arabidopsis thaliana* Samen

Sterilisationslösung

3 % (v/v) Natriumhypochlorit

0,1 % (v/v) Triton X-100

In sterilem ddH₂O ansetzen, sterilfiltrieren und bei 4 °C lagern.

0,05 % Agraroselösung

0,05 % (w/v) Agarose

In ddH₂O ansetzen und autoklavieren.

3.2.6. Lösung zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Inokulationsmedium

5 % (w/v) Saccharose

0,05 % (v/v) Silwet L-77 (Lehle Seeds, Round Rock, TX, USA)

Frisch ansetzen, nicht autoklavieren.

3.2.7. Lösungen zur Extraktion von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Extraktionspuffer

| | |
|-----------|-------------------|
| 0,1 M | TRIS-HCl, pH 8,0 |
| 0,1 M | NaCl |
| 50 mM | EDTA, pH 8,0 |
| 1 % (w/v) | SDS |
| 2,584 mM | β-Mercaptoethanol |

Kaliumacetat

| | |
|-----|--------------|
| 5 M | Kaliumacetat |
|-----|--------------|

pH 4,8 mit KOH einstellen.

3.2.8. Lösungen zur Plasmidisolierung aus *Escherichia coli*

Lösung I

| | |
|-------|------------------|
| 50 mM | Glucose |
| 25 mM | TRIS-HCl, pH 8,0 |
| 10 mM | EDTA, pH 8,0 |

Lösung II

| | |
|-----------|------|
| 0,2 M | NaOH |
| 1 % (w/v) | SDS |

Lösung III

| | |
|--------|--------------|
| 1,32 M | Kaliumacetat |
|--------|--------------|

pH 4,8 mit Essigsäure einstellen.

3.2.9. Lösungen zur Plasmidisolierung aus Hefezellen

Zellsuspensionspuffer A

| | |
|----------|--|
| 50 mM | Glucose |
| 10 mM | EDTA |
| 25 mM | TRIS-HCl, pH 8,0 |
| 150 U/mL | Lyticase (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) |

Aliquotieren und lagern bei – 20 °C.

Denaturierungslösung B

| | |
|-----------|------|
| 0,2 M | NaOH |
| 1 % (w/v) | SDS |

Renaturierungslösung C

| | |
|-----|--------------|
| 3 M | Kaliumacetat |
|-----|--------------|

pH 4,8 mit Essigsäure einstellen.

3.2.10. Lösungen zur Isolierung und Transformation von Petersilienprotoplasten

Enzymlösung

| | |
|-------------|--|
| 0,5 % (w/v) | Cellulase Onozukara R-10 (Duchefa, Haarlem, Niederlande) |
| 1,8 % (w/v) | Macerozym R-10 (Duchefa, Haarlem, Niederlande) |
| 0,24 M | CaCl ₂ |

Frisch ansetzen, ca. 2 h rühren und sterilfiltrieren.

CaCl₂-Lösung

| | |
|--------|-------------------|
| 0,24 M | CaCl ₂ |
|--------|-------------------|

Autoklavieren

P5-Medium (1L)

| | |
|---------|---|
| 3,164 g | Gamborg B5-Medium (Duchefa, Haarlem, Niederlande) |
| 10 mL | 2,4-D-Lösung (s. o.) |
| 96,9 g | Saccharose |

Mit KOH pH 5,7 einstellen, autoklavieren und dunkel lagern.

PEG-Lösung

| | |
|------------|-----------------------------------|
| 25 % (w/v) | PEG 6000 |
| 100 mM | Ca(NO ₃) ₂ |
| 45 mM | Mannitol |

Mit KOH pH 9,0 einstellen, sterilfiltrieren und Aliquots bei – 20 °C lagern.

Ca(NO₃)₂-Lösung

| | |
|---------|---|
| 0,275 M | Ca(NO ₃) ₂ |
| 2 mM | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) aus 100 mM Stammlösung |

pH 6,0 mit KOH einstellen und autoklavieren.

Pep25

100 µg/mL Pep25-Peptid (siehe unten)

Aliquots bei – 20 °C lagern.

3.2.11. Lösungen zur Isolierung und Transformation von *Arabidopsis thaliana* Protoplasten

Enzymlösung

1 % (w/v) Cellulase Onozukara R-10 (Duchefa, Haarlem, Niederlande)

0,25 % (w/v) Macerozym R-10 (Duchefa, Haarlem, Niederlande)

20 mM KCl aus 1 M Stammlösung (sterilfiltriert)

20 mM MES, pH 5,7 aus 0,2 M Stammlösung (sterilfiltriert)

Frisch ansetzen, Enzyme einwiegen und 10 min bei 55°C lösen, auf Raumtemperatur abkühlen lassen und Zugabe von

10 mM CaCl₂ aus 1 M Stammlösung (sterilfiltriert)

0,1 % (w/v) BSA aus 10 % (w/v) Stammlösung (sterilfiltriert)

W5

154 mM NaCl aus 1 M Stammlösung (sterilfiltriert)

125 mM CaCl₂ aus 1 M Stammlösung (sterilfiltriert)

5 mM KCl aus 2 M Stammlösung (sterilfiltriert)

2 mM MES, pH 5,7 aus 0,2 M Stammlösung (sterilfiltriert)

Frisch ansetzen.

MMg

0,4 M Mannitol aus 1 M Stammlösung (sterilfiltriert)

15 mM MgCl₂ aus 2 M Stammlösung (sterilfiltriert)

4 mM MES, pH 5,7 aus 0,2 M Stammlösung (sterilfiltriert)

Bei Raumtemperatur lagern.

30 % PEG-Lösung

30 % (w/v) PEG 4000 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

0,1 M CaCl₂ aus 1 M Stammlösung (sterilfiltriert)

0,2 M Mannitol aus 0,8 M Stammlösung (sterilfiltriert)

Frisch ansetzen.

B5-Medium (1 L)

| | |
|---------|---|
| 3,164 g | Gamborg B5 Medium (Duchefa, Haarlem, Niederlande) |
| 79,27 g | Glucose-Monohydrat |
| 30 g | Saccharose |
| 1 mL | 2,4-D-Lösung (s. o.) |
| 150 µL | 6-Benzylaminopurin aus 0,01 % (w/v) Stammlösung |

pH 5.8 mit KOH einstellen, sterilfiltrieren, bei -20°C lagern.

Flg22

| | |
|--------|----------------------------|
| 100 µM | flg22-Peptid (siehe unten) |
|--------|----------------------------|

Aliquot bei -20 °C lagern.

3.2.12. Lösungen zur Bestimmung der Proteinkonzentration**Bradford-Arbeitslösung zur Proteinbestimmung aus Petersilienprotoplasten**

| | |
|--------|--|
| 2 mL | 5x Roti®-Quant Reagenz (Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland) |
| 5,5 mL | ddH ₂ O |

Frisch ansetzen.

3.2.13. Lösungen des Luciferase-Assays**Glycylglycin**

| | |
|-------|--------------|
| 25 mM | Glycylglycin |
|-------|--------------|

pH 7,8 mit KOH einstellen, Lagerung bei -20 °C.

Luciferin-Stammlösung

| | |
|-------|---------------------|
| 10 mM | D-Luciferin |
| 25 mM | Glycylglycin pH 7,8 |

Lagerung bei -20 °C in 20 µL Aliquots.

LUC-Extraktionspuffer

| | |
|-------|---|
| 0,1 M | NaH ₂ PO ₄ pH 7,8 |
|-------|---|

Lagerung bei 4 °C. Unmittelbar vor Verwendung Zugabe von

| | |
|------|-----|
| 1 mM | DTT |
|------|-----|

LUC-Reaktionspuffer

| | |
|-------|-------------------|
| 15 mM | MgSO ₄ |
|-------|-------------------|

25 mM Glycylglycin pH 7,8

Lagerung bei – 20 °C. Unmittelbar vor Verwendung Zugabe von

5 mM ATP aus 100 mM Stammlösung (Lagerung bei – 20 °C)

LUC-Substratlösung

0,2 mM Luciferin aus Stammlösung (s. o.)

25 mM Glycylglycin pH 7,8

Unmittelbar vor Verwendung herstellen.

3.2.14. Lösung des β -Glucuronidase-Assays

GUS-Reaktionspuffer

50 mM NaPO_4 , pH 7,0

10 mM Na_2EDTA

0,1 % (v/v) Triton X-100

0,1 % (v/v) N-Laurylsarcosin

10 mM β -Mercaptoethanol

1 mM 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (4-MUG)

β -Mercaptoethanol und 4-MUG frisch hinzufügen, nicht autoklavieren, Lagerung bei 4 °C.

3.2.15. Lösungen zur Transformation von Hefezellen

Lithiumacetat

1 M Lithiumacetat

Frisch ansetzen.

50 % PEG 3350

50 % (w/v) PEG 3350 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Frisch ansetzen.

Carrier-DNA

2 mg/mL Lachssperma-DNA (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Bei 4 °C in sterilem TE lösen, aliquotieren und bei -20 °C lagern.

Zum Denaturieren 5 min in kochendem Wasser erhitzen, dann sofort in Eis-Wasser-Gemisch abkühlen lassen und bis zur Verwendung darin lagern.

3.2.16. Lösungen zur denaturierenden SDS-PAGE

5x SDS-Ladepuffer

| | |
|--------------|--------------------------|
| 312,5 mM | TRIS-HCl, pH 6,8 |
| 3,5 % (w/v) | SDS |
| 50 % (v/v) | Glycerin |
| 0,02 % (w/v) | Bromphenolblau |
| 500 mM | β -Mercaptoethanol |

β -Mercaptoethanol frisch dazu geben, Lagerung bei 4 °C.

5x TRIS-Glycin-Puffer

| | |
|-------------|--------|
| 125 mM | TRIS |
| 192 mM | Glycin |
| 0,1 % (w/v) | SDS |

Autoklavieren, vor Gebrauch auf 1x Konzentration verdünnen.

3.2.17. Lösungen zur Coomassie-Färbung

Coomassie-Färbelösung

| | |
|-------------|-------------------------------|
| 10 % (v/v) | Methanol |
| 10 % (v/v) | Essigsäure |
| 0,1 % (w/v) | Coomassie Brilliant Blue R250 |

Coomassie-Entfärber

| | |
|------------|------------|
| 10 % (v/v) | Methanol |
| 10 % (v/v) | Essigsäure |

3.2.18. Western Blot Lösungen

10x PBST

| | |
|-------------|---------------------------|
| 1,37 M | NaCl |
| 120 mM | Na_2HPO_4 |
| 27 mM | KCl |
| 0,5 % (w/v) | Tween-20 |

pH 7,4 mit HCl einstellen, autoklavieren, vor Gebrauch 1x Konzentration verdünnen.

Transfer-Puffer

| | |
|------------|----------|
| 25 mM | TRIS |
| 192 mM | Glycin |
| 20 % (v/v) | Methanol |

Blocking-Puffer

| | |
|-----------|------------------|
| 5 % (w/v) | Magermilchpulver |
|-----------|------------------|

In 1x PBST lösen.

Luminol-Stammlösung

| | |
|--------|---|
| 250 mM | Luminol (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) |
|--------|---|

In DMSO lösen, lichtgeschützt bei 4 °C lagern.

4-IPBA-Stammlösung

| | |
|-------|---|
| 90 mM | 4-Iodo-Phenylboronsäure (4-IPBA, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) |
|-------|---|

In DMSO lösen, lichtgeschützt bei 4 °C lagern.

Entwicklerlösung 1 (100 mL)

| | |
|--------|---------------------|
| 1 mL | Luminol-Stammlösung |
| 4,4 mL | 4-IPBA-Stammlösung |
| 10 mL | 2 M TRIS, pH 8,8 |

Auf 100 ml mit ddH₂O auffüllen, lichtgeschützt bei 4 °C in Plastikbehälter lagern.

Entwicklerlösung 2 (200 mL)

| | |
|--------|---|
| 25 mg | Na ₄ (PO ₄) ₂ ·10H ₂ O |
| 108 µL | 30 % H ₂ O ₂ |

Mit Phosphorsäure (85 %) ca. pH 4 einstellen. Auf 100 ml mit ddH₂O auffüllen. Bei 4 °C in Plastikbehälter lagern.

Stripping-Lösung (100 mL)

| | |
|---------|--------------|
| 57,3 g | Guanidin-HCl |
| 1,14 mL | Essigsäure |
| 10 mL | 1x PBST |

3.2.19. Lösungen zur Überexpression und Aufreinigung His-getaggtter Proteine

NPI-10, NPI-20 etc.

| | |
|------------|----------------------------------|
| 50 mM | NaH ₂ PO ₄ |
| 300 mM | NaCl |
| 10-500 mM* | Imidazol |

pH 8,0 mit NaOH einstellen und sterilfiltrieren.

**Je nach gewünschtem Puffer kann die Imidazol-Konzentration variiert werden. Z.B. 10 mM Imidazol für NPI-10, 20 mM Imidazol für NPI-20 usw.*

3.2.20. Lösungen für Electrophoretic Mobility Shift Assays

6x EMSA Ladepuffer

| | |
|--------------|----------------|
| 0,25 % (w/v) | Bromphenolblau |
| 0,25 % (w/v) | Xylen-Cyanol |
| 40 % (w/v) | Saccharose |

Aliquotieren, Lagerung bei – 20 °C.

10x Gelshift-Bindungspuffer

| | |
|--------|------|
| 100 mM | TRIS |
| 500 mM | KCl |
| 10 mM | DTT |

Autoklavieren, DTT frisch zugeben, pH 7,5 mit HCl einstellen.

5x TBE

| | |
|--------|----------|
| 450 mM | TRIS |
| 450 mM | Borsäure |
| 10 mM | EDTA |

pH 8,3 mit HCl einstellen und autoklavieren.

3.3. Kits

| | | |
|---|--|--------------------------|
| Biotin 3' End DNA Labeling Kit | Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA | Bestellnummer: 89818 |
| LightShift Chemiluminescent EMSA Kit | Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA | Bestellnummer: 20148 |
| NucleoBond® Xtra Midi EF | Macherey-Nagel, Düren, Deutschland | Bestellnummer: 740420.50 |

| | | |
|---|---|---------------------------|
| NucleoSpin Gel and PCR Clean-up | Macherey-Nagel, Düren, Deutschland | Bestellnummer: 74609.250 |
| NucleoSpin Plasmid EasyPure | Macherey-Nagel, Düren, Deutschland | Bestellnummer: 740727.250 |
| NucleoSpin RNA Plant | Macherey-Nagel, Düren, Deutschland | Bestellnummer: 740949.250 |
| RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis | Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA | Bestellnummer: K1631 |

3.4. Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Plastikmaterialien, wie Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Petrischalen und Falkons wurden von der Firma Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland) bezogen. Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden vor Gebrauch autoklaviert (40 min, 121 min). Die Mikrotiterplatten zur Messung von LUC- und GUS-Aktivitäten wurden bei Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland) bezogen. Das Nylon-Siebgewebe (Maschenweite 60 µM) zur Isolierung von *A. thaliana* Protoplasten wurde von W. O. Schmidt GmbH Laboratoriumsbedarf (Braunschweig, Deutschland) bezogen. Weitere weniger gebräuchliche Materialien sind im entsprechenden Protokoll mit Herstellerangaben versehen.

3.5. Geräte

| | |
|---|-----------------------|
| ChemiDoc™ Touch Imaging System | Bio-Rad Laboratories |
| Celloshaker | Renner GmbH |
| Elektroporator Gene PulserR II' | Bio-Rad Laboratories |
| Feinwaage A120S | Sartorius AG |
| Gel-Dokumentationsgerät Geldoc XR | Bio-Rad Laboratories |
| Gel Dryer Model 583 | Bio-Rad Laboratories |
| Gelelektrophoresekammern | Biozym |
| Horizontale Gelelektrophoreseapparaturen | Biozym |
| Kryostat Julabo F10 | JULABO GmbH |
| Lichtschrank CU-32L und CU-36L/4 | Percival Scientific |
| Mikrotiterplatten-Leser TriStar LB 941 | Berthold Technologies |
| Nano Photometer™ (7122V1.6.1) | Implen |
| PCR-Thermocycler, Mastercycler, Eppendorf | Eppendorf |

| | |
|--|--|
| pH-Meter | HANNA Instruments |
| Photometer Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrophotometer | Pharmacia Biotech |
| Tischzentrifuge Biofuge Pico | Heraeus Instruments GmbH |
| Ultraschall-Homogenisator | Labsonic U, B. Braun Biotech International |
| Untertischzentrifuge GS-6KR | Beckman Coulter |
| UV-Crosslinker Stratalinker | Stratagene |
| Vakuumpumpe | Knf Neuberger Laboport |
| VortexVF2 | IKAR-Werke GmbH & Co. KG |
| Vertikale Gelelektrophoreseapparatur | Bio-Rad Laboratories |
| MiniProtean Tetra System | |
| Wasserbad | GFL mbH |
| Zentrifuge AllegraTM 64R Centrifuge, | Beckman Coulter |
| Zentrifuge Biofuge 22R | Heraeus Instruments GmbH |
| Zentrifuge Sorvall RC 5B Suberspeed Centrifuge | DuPont Instruments |

3.6. **Analysesoftware**

| | |
|--------------------|----------------------|
| CLC Main Workbench | CLC Bio |
| GATCViewer | GATC Biotech |
| Image Lab | Bio-Rad Laboratories |
| Snapgene | GSL Biotech LLC |

3.7. **Bakterienstämme**

Escherichia coli

Zur Klonierung von DNA-Konstrukten wurde der *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stamm XL1 Blue MRF' (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) verwendet. Zur Überexpression von His-getaggted Proteinen wurde der Bakterienstamm BL21 (Stratagene, San Diego, CA, USA) verwendet. Die Kultivierung von *E. coli* ist unter 3.15.1 beschrieben.

Agrobacterium tumefaciens

Zur stabilen Transformation von *A. thaliana* Pflanzen wurde der *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*)-Stamm C58C1 verwendet (Deblaere *et al.*, 1985). Der Stamm enthält das Ti-Plasmid pGV2260. Die Antibiotika Carbenicillin und Rifampicin werden zur Selektion verwendet. Unter 3.15.2 ist die Kultivierung von *A. tumefaciens* beschrieben.

3.8. Hefestämme

Saccharomyces cerevisiae

Der *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)-Stamm Y1HGold (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) wurde zur Durchführung von Yeast One-Hybrid Screens verwendet. Die Kultivierung der Hefe ist unter 3.15.3 beschrieben.

3.9. Pflanzenmaterial

Arabidopsis thaliana

In der vorliegenden Arbeit wurde *A. thaliana* Ökotyp Columbia (Col-0) verwendet. Die Samen lagen bereits im Labor vor. Die Kultivierung von *A. thaliana* ist unter 3.15.6 beschrieben.

Petroselinum crispum

Zur Isolierung und transienter Transformation von Petersilienprotoplasten wurde die Kalluskultur Pc 5/3 von *Petroselinum crispum* (*P. crispum*) verwendet (Imre Somssich, Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln). Unter 3.15.9 ist die Kultivierung der Zellkultur beschrieben.

3.10. Primer und Oligonukleotide

Primer und Oligonukleotide wurden bei Life Technologies (Darmstadt, Deutschland) bestellt und unter anderem für Klonierungen und EMSAs verwendet. Eine genaue Auflistung mit Sequenzen und Anwendungen befindet sich im Anhang unter 9.2.

3.11. *A. thaliana* Transkriptionsfaktor only-library

Zur Identifizierung von möglichen Transkriptionsfaktoren, die an bestimmte *cis*-Sequenzen binden, wurde die *A. thaliana* Transkriptionsfaktor *only-library* (Mitsuda *et al.*, 2010) verwendet. Die cDNA-Bank enthält 1498 verschiedene Transkriptionsfaktoren im pDEST_GAD424 Vektor. Im Anhang unter 9.2 sind die Glycerin- und DNA-Nummer der entsprechenden Lagerung angegeben.

3.12. Peptide

Zur Analyse der MAMP-Responsivität wurden verschiedene Elicitoren verwendet.

Das Peptid Pep25 (siehe Pep25 Lösung 3.2.10) mit der Aminosäuresequenz DVTAGAEVWNQPVRGFKVYEQTEMT wurde von SeqLab (Göttingen, Deutschland) bezogen.

Das Peptid flg22 (siehe flg22 Lösung 3.2.11) wurde von PANATes GmbH (Heilbronn, Deutschland) synthetisiert und besitzt die Aminosäuresequenz QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA.

3.13. Plasmide

3.13.1. pBT10GUS-d35SLUC

Der Vektor pBT10GUS-d35SLUC wurde aus dem Vektor pBT10GUS von Koschmann *et al.* (2012) erstellt. In Abbildung 8 ist eine Vektorkarte von pBT10GUS-d35SLUC dargestellt. Der Vektor wurde für transiente Reporter-gen-Assays in Petersilienprotoplasten verwendet. pBT10GUS-d35SLUC enthält eine Ampicillin-Resistenz (AmpR), einen *origin of replication* (ori), zwei Nopalinsynthase Terminatoren (Tnos), das Reporter-gen der Luciferase (LUC) unter Kontrolle des doppelten 35S CaMV-Promotors (d35S), welches zur Normalisierung diente, sowie ein GUS-Reporter-gen downstream eines 35S-Minimalpromotors (TATA). Tetramere von *cis*-Sequenzen wurden über die Restriktionsschnittstellen *SpeI* und *XbaI* upstream des Minimalpromotors und des GUS-Reporter-gens kloniert.

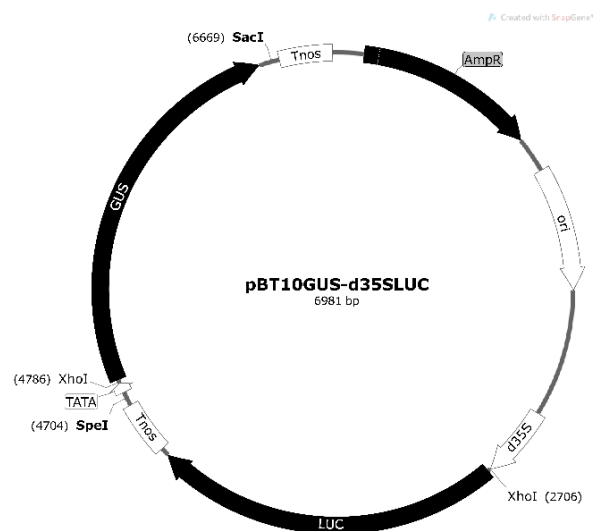


Abbildung 8: pBT10GUS-d35SLUC Vektor (modifiziert nach Koschmann *et al.*, 2012)

3.13.2. pBT10-LUC

Der Vektor pBT10-LUC (Wehner *et al.*, 2011) wurde für transiente Reporter-genexperimente in *A. thaliana* Protoplasten verwendet. Der Vektor enthält ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR), einen

origin of replication (ori), sowie einen Nopalin Synthase Terminator (Tnos). Über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XbaI* wurden Tetramere von *cis*-Sequenzen upstream eines Minimalpromotors (35S) und des LUC-Reportergens kloniert. In Abbildung 9 ist die Vektorkarte dargestellt.

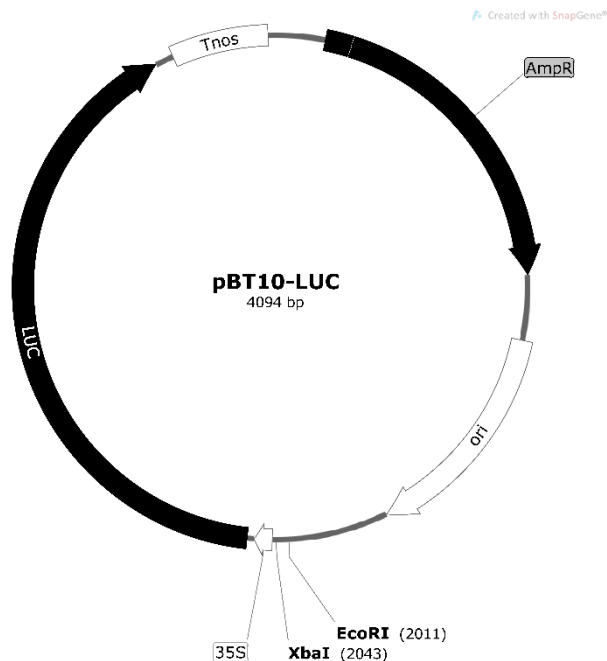


Abbildung 9: Vektorkarte von pBT10-LUC

3.13.3. pRT103-GUS

Der Vektor pRT103-GUS wurde zur Normalisierung der LUC-Reportergenaktivität in *A. thaliana* Protoplasten verwendet (Töpfer *et al.*, 1993). Dieser enthält ein konstitutiv exprimiertes GUS-Reportergen.

3.13.4. pHIS2.1

Der Bait-Vektor pHIS2.1 (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) wurde in Yeast One-Hybrid Screens eingesetzt. Der Vektor enthält ein Kanamycin-Resistenzgen und der ori zur Selektion und Vermehrung in *E. coli*. Zur Selektion in Hefezellen enthält der Vektor den auxotrophen Marker TRP1, wodurch der Hefe Wachstum auf Medium ohne Tryptophan ermöglicht wird. Über einen Teil der *centromere sequence* (CEN) und *autonomously replicating sequence* (ARS) wird die Replikation des Vektors und eine Einzelkopie pro Hefezelle ermöglicht. Über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *SacI* wurden Tetramere der zu untersuchenden *cis*-Sequenzen in den Vektor kloniert. In Abbildung 10 ist der Vektor grafisch dargestellt.

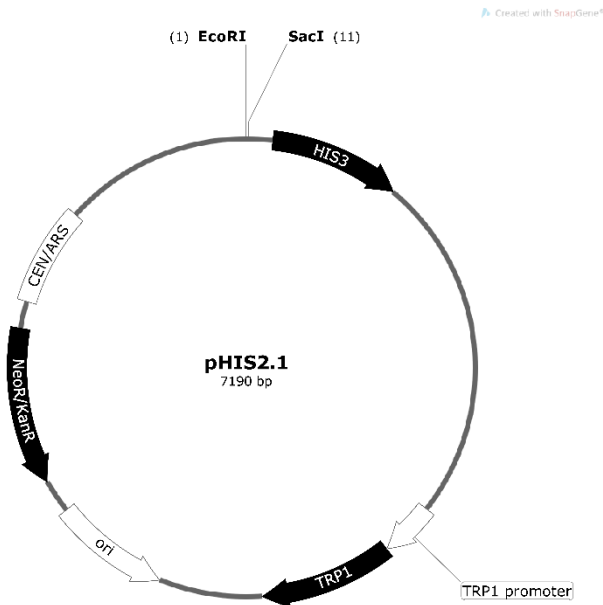


Abbildung 10: pHIS2.1 Vektorkarte (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)

3.13.5. pGADT7AD

Der Vektor pGADT7AD (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) ist ein Hefeexpressionsvektor, der eine Expression von einem Protein fusioniert mit der Aktivierungsdomäne (AD) des Hefetranskriptionsfaktors GAL4 ermöglicht. Die Expression des Fusionsproteins wird durch den *ADH1* Promotor konstitutiv reguliert. Zur Selektion und Vermehrung des Plasmides in Hefezellen ist der Selektionsmarker *Leu2* und der 2 μ origin vorhanden. Zur Vermehrung in *E. coli* enthält der Vektor eine Ampicillin-Resistenzgen und einen ori. In Abbildung 11 ist die Vektorkarte dargestellt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Vektor für Klonierungen der Aktivierungsdomäne eingesetzt.

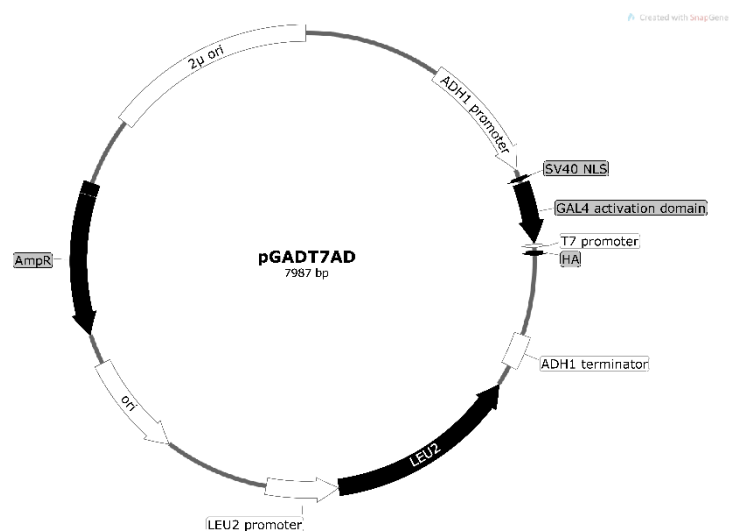


Abbildung 11: Vektorkarte von pGADT7AD (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich)

3.13.6. pORE-O2-d35S-pA

Der Vektor pORE-O2-d35S-pA wurde von Machens *et al.* (2014) erstellt und ist ein Derivat des T-DNA Vektors pORE-O2 (Coutu *et al.*, 2007). Der Vektor wurde zur Expression von Transkriptionsfaktoren in Protoplasten verwendet. Durch den 35S-Promotor erfolgt die Expression konstitutiv. Für die Erstellung von transgenen *A. thaliana* Pflanzen wird der Bereich zwischen der rechten und linken Bordersequenz als T-DNA in das pflanzliche Genom integriert. Dadurch enthalten die transgenen Linien eine Kanamycin-Resistenz. Zur Selektion und Vermehrung in Bakterien enthält der Vektor ein Kanamycin-Resistenzgen und *oris*. In Abbildung 12 ist die Vektorkarte dargestellt.

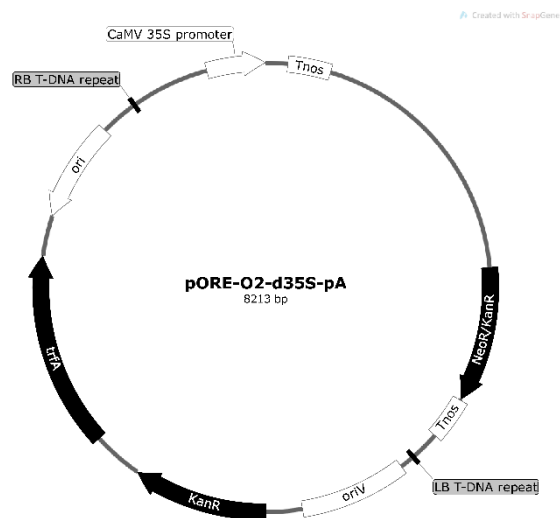


Abbildung 12: T-DNA Vektor pORE-O2-d35S-pA

3.13.7. pQE-Vektorsystem

Das pQE-Vektorsystem (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurde für die Proteinüberexpression in *E. coli* verwendet. Das System mit den Vektoren pQE-30, 31 und 32 ermöglicht eine N-terminale Fusion eines 6x His-Tag an das Protein, wodurch eine gezielte Aufreinigung des rekombinanten Proteins ermöglicht wird. Die drei Vektoren enthalten eine *multiple cloning site* mit drei verschiedenen Leserastern. Die Expression wird durch das doppelt vorkommende Lac-Operon reguliert. Eine Induktion der Expression erfolgt durch IPTG, welches vom LacI-Repressor gebunden wird und dieser dadurch inaktiviert wird. Der Vektor verleiht den Bakterien eine Ampicillin-Resistenz. In Abbildung 13 ist das Vektorsystem dargestellt.

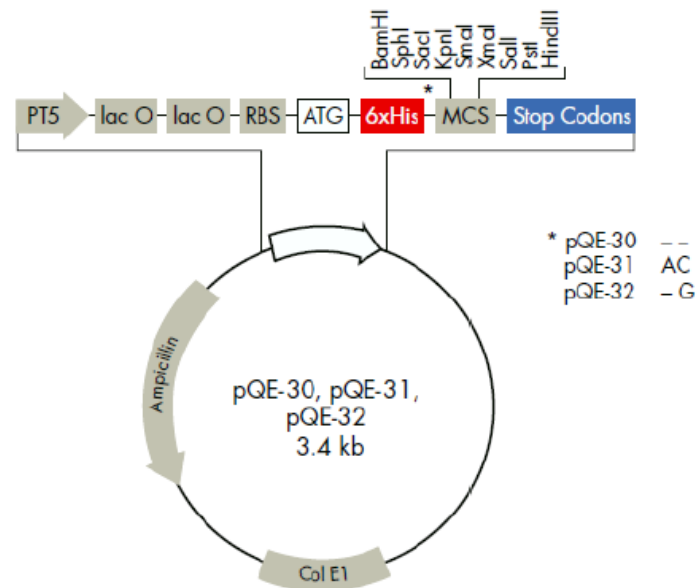


Abbildung 13: pQE-30 Vektorkarte (Qiagen, Hilden, Deutschland)

3.13.8. pREP4

Für eine Induzierbarkeit von rekombinanten Proteinen durch das pQE-Vektorsystem wird der LacI-Repressor benötigt. Auf den pQE-Vektoren fehlt das Gen des LacI-Repressors. Dieser wird durch den Vektor pREP4 *trans* im Bakterium zur Verfügung gestellt und konstitutiv exprimiert. Das low-copy Plasmid vermittelt dem Bakterienstamm eine Kanamycin-Resistenz. In Abbildung 14 ist der Vektor dargestellt.

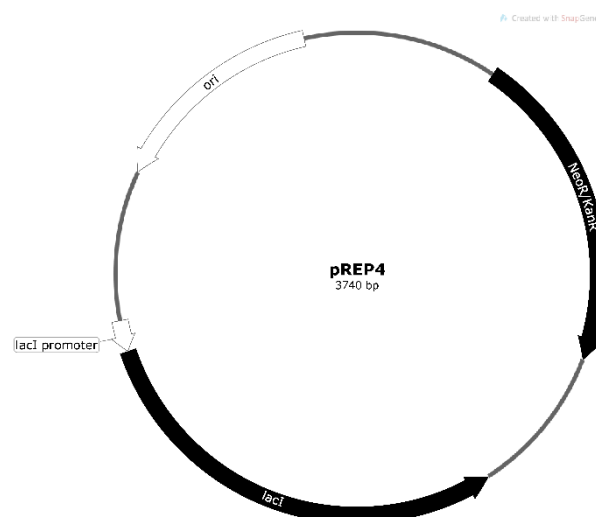


Abbildung 14: Vektor pREP4 (Qiagen, Hilden, Deutschland)

3.13.9. pRARE

Zur Optimierung der Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* wird das Plasmid pRARE (Novagene; Darmstadt, Deutschland) verwendet. Das Plasmid vermittelt eine Chloramphenicol Resistenz und seltene tRNAs für die Codons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA und CGG werden exprimiert, wodurch eine verbesserte Expression in Bakterien ermöglicht wird.

3.13.10. UBQ10_XVE_MSC_HA_Bar

Der T-DNA Vektor UBQ10_XVE_MSC_HA_Bar enthält eine β -Estradiol induzierbare Expressionskassette, welche im pGPTV II Vektor vorhanden ist. Der Vektor wurde von Schlücking *et al.* (2013) erstellt und kann zur Erstellung von transgenen *A. thaliana* Pflanzen verwendet werden. Durch den *UBQ10* Promotor wird eine konstitutive Expression des rekombinanten XVE Fusionsproteins ermöglicht. Das rekombinante Fusionsprotein besteht aus der DNA-Bindedomäne des bakteriellen Repressor LexA (X), der Aktivierungsdomäne von VP16 des *Herpes simplex* Virus (V) und der C-terminalen Region des menschlichen Estrogenrezeptors (E). Durch Verabreichung von β -Estradiol wird dieses von der Rezeptordomäne gebunden, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt und das Fusionsprotein an den LexA-Operator bindet und dabei der 35S Minimalpromotor aktiviert wird. Der Vektor ermöglicht eine C-terminale Fusion eines HA-Tags mit rekombinanten Proteinen. Zur Selektion in Bakterien enthält der Vektor ein Kanamycin-Resistenz und für eine Selektion von Pflanzen das Herbizid-Resistenzgen Bar. In Abbildung 15 ist die Expressionskassette dargestellt.

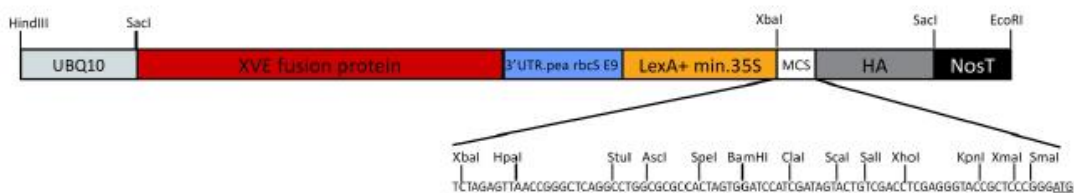


Abbildung 15: Karte der β -Estradiol induzierbaren Expressionskassette im pGPTV II Vektor (Schlücking *et al.*, 2013)

3.14. Antikörper

Tabelle 2: Antikörper

| Antikörper | Organismus | Verdünnung | Hersteller |
|--------------------------------------|------------|------------|---|
| Anti-His-pAB | Kaninchen | 1:1000 | Carl-Roth |
| Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody | Ziege | 1:3000 | Cell Signaling TECHNOLOGY (New England Biolabs) |

| | | | |
|---------------------|-----------|--------|-------------------|
| Anti-NF- κ B | Kaninchen | 1:1000 | Thermo Scientific |
| Anti-HA | Maus | 1:1000 | Covance |
| Anti-Maus | Ziege | 1:5000 | Dianova |

3.15. Methoden

3.15.1. Kultivierung von *Escherichia coli*

Das Bakterium *E. coli* wurde für die Vermehrung von Plasmiden und Überexpression von Proteinen verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C in LB-Medium. Die verschiedenen Stämme wurden auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht inkubiert. Die Platten konnten bei 4 °C bis zu vier Wochen gelagert werden. Zur weiteren Vermehrung wurden die Einzelkolonien im Flüssigmedium unter Schütteln inkubiert. Für eine langfristige Lagerung wurde eine Glycerindauerkultur erstellt (3.15.4).

3.15.2. Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens*

Zur stabilen Transformation von T-DNA in das Genom von *A. thaliana* wurde der *A. tumefaciens* Stamm C58C1 (Deblaere *et al.*, 1985) verwendet. Dieser trägt das Ti-Plasmid pGV2260. Die Selektion erfolgte auf Rifampicin (50 mg/L) und Carbenicillin (50 mg/L). Die Kultivierung erfolgte bei einer Temperatur von 25 °C in LB-Medium. Die verschiedenen Stämme wurden auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und für zwei Tage inkubiert. Die Platten konnten bei 4 °C bis zu vier Wochen gelagert werden. Einzelkolonien konnten in Flüssigmedium unter Schütteln weiter Vermehrt werden. Für eine langfristige Lagerung wurde eine Glycerindauerkultur erstellt (3.15.4).

3.15.3. Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Durchführung von Yeast One-Hybrid Screens wurde der *S. cerevisiae*-Stamm Y1HGold (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) verwendet. Die Kultivierung der Hefe erfolgte bei einer Temperatur von 30 °C in 2x YPDA oder zur Selektion von Plasmid-tragenden Stämmen auf SD Drop-Out-Medium. Die verschiedenen Stämme wurden auf entsprechenden Agarplatten ausgestrichen und für zwei Tage kultiviert. Zur weiteren Vermehrung konnten Einzelkolonien in Flüssigmedium unter

Schütteln inkubiert werden. Für eine langfristige Lagerung wurde eine Glycerindauerkultur erstellt (3.15.4).

3.15.4. Erstellung von Dauerkulturen

Zur Erstellung von bakteriellen Dauerkulturen wurden 800 µL einer entsprechenden Flüssigkultur mit 200 µL 100 % Glycerin gemischt und bei – 80 °C gelagert.

Dauerkulturen von Hefen wurden erstellt, indem eine große, frische Kolonie in 600 µL 2x YPDA resuspendiert und mit 200 µL 100 % Glycerin gemischt wurde. Die Kultur wurde bei – 80 °C gelagert.

Eine genaue Auflistung der verschiedenen verwendeten Stämme ist unter 9.1 aufgeführt.

3.15.5. Sterilisation von *Arabidopsis thaliana* Samen

Für eine sterile Anzucht von transgenen bzw. Wildtyp *A. thaliana* Col-0 Pflanzen wurden die Samen einer Oberflächensterilisation unterzogen. Dazu wurde eine entsprechende Menge an Samen in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und für 2 min in 70 % Ethanol unter Schütteln inkubiert. Nach der Ethanol-Behandlung wurden die Samen für 8 min in 1 mL Sterilisationslösung geschüttelt. Nach viermaligem Waschen mit jeweils 1 mL ddH₂O wurden die Samen in ca. 500 µL 0,05 % Agarose resuspendiert und auf ½ MS-Platten gegebenenfalls mit Antibiotikum bzw. Herbizid vereinzelt ausgebracht.

3.15.6. Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

Zur Selektion von transgenen *A. thaliana* Pflanzen wurden Samen auf ½ MS-Platten mit entsprechendem Antibiotikum bzw. Herbizid vereinzelt ausgebracht. Die Platten wurden unter der Clean Bench offen stehengelassen, bis die Flüssigkeit der 0,05 % Agarose eingetrocknet war. Daraufhin wurden die Platten mit Leukopor verschlossen. Zur Induktion der Samenkeimung wurden die Samen auf den Platten für zwei Tage bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die anschließende Kultivierung erfolgte bei 24 °C unter Kurztag- (8 h Licht, 16 h Dunkelheit) oder Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) in einem Lichtschrank (CU-36L/4, Percival Scientific, Perry, IA, USA).

Nach zwei Wochen wurden die selektierten transgenen Linien in Erde umgesetzt. Wie oben beschrieben wurden die Pflanzen kultiviert und regelmäßig gegossen.

Bei unsterilen Erdkulturen wurden die Samen direkt auf feuchter Erde ausgebracht und ebenfalls für zwei Tage bei 4 °C in Dunkelheit inkubiert. Danach wurden die Pflanzen entsprechend der Beschreibung oben kultiviert.

Zur Vermehrung wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen kultiviert. Sobald sich ein Blütenspross gebildet hatte, wurde zur Vermeidung gegenseitiger Bestäubung das ARACON-System (BETATECH, Gent, Belgien) verwendet. Nach Bildung von reifen Samen wurden die Pflanzen nicht mehr gewässert. Zur Ernte der Samen wurden die vertrockneten Pflanzen zwischen den Händen zerrieben, sodass die Samen auf einem Blatt Papier aufgefangen wurden. Die Samen wurden zur Trennung von übrigen Pflanzenmaterialien mehrere Male gesiebt und bei RT in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß gelagert.

3.15.7. Stabile Transformation und Selektion von transgenen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Durch die Methode des Floral Dip wurden in dieser Arbeit T-DNA Konstrukte stabil in das Genom von *A. thaliana* integriert. Die Methode erfolgte mit einigen Modifikationen nach Clough und Bent (1998). Wie unter 3.15.6 beschrieben erfolgte die Kultivierung von *A. thaliana* in einer Erdkultur. Nach Bildung der ersten Blütenstände wurden diese entfernt, wodurch eine vermehrte Blütenbildung stimuliert wurde. Für eine Transformation sind ungeöffnete Blüten am besten geeignet.

Für die Transformation der Pflanzen durch *A. tumefaciens* wurde eine 5 mL Vorkultur in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika für 24 h bei 25 °C unter Schütteln kultiviert. Mit 500 µL dieser Vorkultur wurde eine 400 mL Hauptkultur angeimpft und für weitere 24 h bei 25 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden durch eine Zentrifugation bei 4000 g für 30 min geerntet. Das Pellet wurde in Inokulationsmedium zu einer OD₆₀₀ von 0,8 resuspendiert.

Zur Transformation wurden die Blüten der Pflanzen für 3 sec unter leichtem Schwenken in die Zellsuspension getaucht. Anschließend wurden die Pflanzen für 48 h in einer waagerechten Position unter einer durchsichtigen Plastikabdeckung inkubiert. Die Abdeckung dient zur Generation einer hohen Luftfeuchtigkeit. Nach Entfernung der Abdeckung wurden die Pflanzen entsprechend 3.15.6 bis zur Samenreife kultiviert. Die Samen wurden entsprechend 3.15.5 sterilisiert und auf ½ MS-Medium mit Antibiotikum bzw. Herbizid ausgebracht und selektiert. Die resistenten T0-Pflanzen wurden in Erde umgesetzt und weiter kultiviert. Anhand der durch Selbstung entstandenen T1-Generation konnte die Anzahl der T-DNA-Integrationen bestimmt werden. Wohingegen in der T2-Generation eine homozygote bzw. heterozygote Integration der T-DNA bestimmt wurde.

3.15.8. β -Estradiol-Behandlung von stabil transformierten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Unter Verwendung der Expressionskassette aus dem T-DNA Vektor UBQ10_XVE_MSC_HA_Bar kann die Expression von rekombinanten Proteinen in stabil transformierten *A. thaliana* Pflanzen über β -Estradiol erfolgen (3.13.10). Die Verabreichung von β -Estradiol ist abhängig von Entwicklungsstadium der transgenen Linien. 14 Tage alte Keimlinge wurden mit 5 μ M β -Estradiol in $\frac{1}{2}$ MS⁻ Platten für bis zu fünf Tagen behandelt. 6 - 8 Wochen alte Pflanzen wurden bis zu fünf Tage mit 100 μ M β -Estradiol besprüht (Schlückling *et al.*, 2013).

3.15.9. Kultivierung von *Petroselinum crispum* Zellkultur

Die Petersilienkultur Pc 5/3 wurde bei 23 °C unter Schütteln bei 160 rpm in Dunkelheit in einem 100 mL Erlenmeyerkolben, der 40 mL HA-Medium enthält, kultiviert. Alle sieben Tage wurden etwa 3 mL der Kultur in neues HA-Medium überführt.

Zur Isolierung von Protoplasten wurde eine Subkultur benötigt. Dafür wurde mit einem sterilen Natriumlöffel (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) Zellmaterial aus einer sieben Tage alten Kultur in 40 mL frisches HA-Medium überführt, für fünf Tage kultiviert und wie unter 3.15.32 beschrieben bearbeitet.

3.15.10. Erstellung und Bearbeitung von DNA-Konstrukten

In dieser Arbeit wurden DNA-Moleküle erstellt und bearbeitet. Dabei wurden Standardprotokolle (Sambrook und Russell, 2001) oder Herstellerangaben von z.B. Restriktionsenzymen verwendet.

3.15.11. Polymerase-Kettenreaktion

Bei einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können spezifische DNA-Fragmente amplifiziert werden. Die PCR wird in die Abschnitte Denaturierung, Annealing und Elongation unterteilt. Bei der Denaturierung wird die doppelsträngige Template-DNA durch Hitze einzelsträngig. Bei der Annealing-Phase können sich Primer (Oligonukleotide), die den zu amplifizierenden Abschnitt flankieren, an die einzelsträngige Template-DNA anlagern. Mit Hilfe von thermostabilen DNA-Polymerasen erfolgt die Elongation des 3'-Endes der Primer durch komplementäre Basen (dNTPs) des Template-Stranges. Bei mehrfacher Wiederholung dieser drei Schritte wird das zu amplifizierende DNA-Fragment exponentiell vermehrt. Bei der PCR sind die verschiedenen Temperaturen der unterschiedlichen Phasen abhängig

von den verwendeten Primern und der Polymerase, sowie von der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes.

Abhängig des Klonierungszweckes wurden zwei verschiedene Polymerasen verwendet. Die DreamTaq-Polymerase hat eine hohe Syntheserate, jedoch besitzt sie keine *proof-reading* Aktivität. Die PWO-Polymerase besitzt hingegen eine *proof-reading* Aktivität, sodass Fehlpaarungen verbessert werden, wodurch die Synthesedauer geringer ist.

Ein typischer PCR-Ansatz und –Programm setzt sich folgendermaßen zusammen:

Tabelle 3: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes mit dazugehörigem PCR-Programm

| PCR-Ansatz | | PCR-Programm | | | |
|----------------------------------|---------------------------|---------------|------------|----------|--------------|
| Komponenten | Volumen [μL] | Zyklus | Temperatur | Dauer | Wiederholung |
| 10x Puffer | 2,5 | Denaturierung | 95 °C | 3 min | 1x |
| dNTP-Mix [2,5 mM pro dNTP] | 1 | | | | |
| 20 μM Primer 1 | 1 | Denaturierung | 95 °C | 30 sec | |
| 20 μM Primer 2 | 1 | Annealing | 55 °C* | 30 sec | 35x |
| Template-DNA [0,1 – 1 ng DNA] | 1 | Elongation | 72 °C** | 1 min*** | |
| Polymerase [5 U/ μL] | 0,25 | | | | |
| ddH ₂ O | 18,25 | Elongation | 72 °C** | 3 min | 1x |
| Gesamt | 25 | Kühlung | 4 °C | ∞ | |

* Die Annealing-Temperatur ist abhängig von der Primerlänge und des GC-Gehalts. Zumeist wurde das Annealing bei 55 °C durchgeführt.

** Die Elongations-Temperatur ist abhängig von der verwendeten Polymerase und wurde entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

*** Die Elongations-Dauer ist abhängig von der verwendeten Polymerase und der Größe des zu amplifizierenden PCR-Fragmentes. Die Dauer wurde nach Herstellerangaben berechnet.

Bei einer Kolonie-PCR wurden die zu untersuchenden bakteriellen Kolonien mit einer Pipettenspitze zuerst auf eine LB-Platte mit entsprechenden Antibiotikum übertragen und anschließend wurde mit der Pipettenspitze im PCR-Ansatz mehrmals auf- und abpipettiert. Durch den Denaturierungsschritt im PCR-Programm werden die überführten Bakterien aufgeköcht und die Template-DNA freigesetzt.

In Abhängigkeit des jeweiligen Experimentes wurde das amplifizierte DNA-Fragment auf einem Agarosegel analysiert, durch das „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“ Kit aufgereinigt oder einer Restriktionsspaltung unterzogen.

3.15.12. Agarose-Gelelektrophorese

Eine elektrophoretische Auftrennung und Visualisierung von Nukleinsäure-Fragmenten erfolgt in einem Agarosegel. In einem elektrischen Feld trennt sich DNA bzw. RNA abhängig von Größe und Konformation aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen auf. Mit Hilfe der DNA bzw. RNA-interkalierenden Substanz Ethidiumbromid fluoreszieren Nukleinsäure-Fragmente bei Anregung von UV-Licht und können detektiert werden.

Abhängig der zu analysierenden Größen der Fragmente wurden 1 – 2 % (w/v) Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde mit dem 1x TAE Puffer vermengt und in einer Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C wurde die Lösung mit 1/20000 Volumen (10 mg/mL) Ethidiumbromid versetzt, in einen Gelträger mit Kamm gegossen und ausgehärtet. Die zu analysierenden Proben wurden mit 1/10 Volumen 10x DNA-Ladepuffer bzw. 1/5 Volumen 5x RNA-Ladepuffer gemischt, auf das Gel aufgetragen und in 1x TAE bei 100 V aufgetrennt. Als Größenmarker wurden GeneRuler 1 kB DNA Ladder, MassRuler Low Range DNA Ladder oder RiboRuler High Range RNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) verwendet. Unter UV-Licht wurden die Gele fotografiert und anhand ihrer Größe ausgewertet.

3.15.13. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente können aus PCR-Reaktionen oder aus Agarosegelen aufgereinigt werden. Hierfür wurde das „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“ Kit (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet.

3.15.14. Restriktionsspaltung von DNA-Fragmenten

Restriktionsenzyme können DNA-Fragmente an bestimmten DNA-Sequenzen spalten. Die dabei entstandenen Fragmente tragen abhängig des verwendeten Enzyms *sticky* oder *blunt ends*. Zur Ermittlung von Restriktionsschnittstellen wurde die Analysesoftware CLC Main Workbench (CLC Bio) oder das Internettool RestrictionMapper (www.restrictionmapper.org) verwendet.

In Tabelle 4 ist ein typischer Restriktionsansatz aufgeführt.

Tabelle 4: Typischer Restriktionsansatz

| | |
|------------------------|------------|
| ddH ₂ O | X µL |
| 10x Restriktionspuffer | 2 µL |
| DNA | 0,2 – 2 µg |
| Enzym(e) | 0,6 µL |
| Gesamt | 20 µL |

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA) bezogen. Zur Bestimmung der optimalen Pufferbedingungen bei Restriktionsspaltungen mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen wurde das Internettool DoubleDigest Calculator (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) verwendet. Der Restriktionsansatz wurde für 2 Stunden bis über Nacht bei 37 °C inkubiert. Um Religation bei gespaltenen Vektoren zu verhindern, wurden diese mittels alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Dazu wurde 1 µL FastAP (1 Unit, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) zu dem Restriktionsansatz gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

3.15.15. Ligation

DNA-Fragmente können in Vektoren über gleiche Restriktionsschnittstellen ligiert werden. Die T4-Ligase katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat-Resten und 3'-OH-Gruppen von DNA-Strängen. In der Regel wird ein dreifacher Überschuss an Insert-Fragmenten in einer Ligationsreaktion eingesetzt. Ein typischer Ligationsansatz ist in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Typischer Ligationsansatz

| | |
|--------------------------|--------|
| ddH ₂ O | X µL |
| 10x T4 DNA Ligase Puffer | 2 µL |
| 50 ng Vektor | Y µL |
| 3x Insert | Z µL |
| T4 DNA Ligase | 0,3 µL |
| Gesamt | 20 µL |

Der Ligationsansatz wurde bei 16 °C für mindestens 1 Stunde bis über Nacht inkubiert.

3.15.16. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen erfolgte am Nano Photometer (Implen, München, Deutschland). Von der Probe wurden 2 µL bei den Wellenlängen 260, 280 und 230 nm vermessen. Aus

der Messung bei OD_{260} kann die Konzentration berechnet werden ($OD_{260} = 1$ entspricht 50 $\mu\text{g/mL}$ dsDNA bzw. 40 $\mu\text{g/mL}$ ssRNA). Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} gibt Aufschluss über Verunreinigung mit Proteinen und dieser Wert sollte zwischen 1,8 und 2,0 bei reinen Proben liegen. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{230} zeigt Verunreinigung mit Polysacchariden und Phenolen an und dieser Wert sollte bei reinen Proben über 2,0 sein.

3.15.17. Annealing von Oligonukleotiden

Komplementäre einzelsträngige Oligonukleotide können zu doppelsträngigen DNA-Fragmenten annealt werden. Dazu wurden die komplementären Moleküle im Verhältnis 1:1 mit gleicher Konzentration vermischt. In einem Thermocycler wurden die Proben für eine Minute bei 95 °C inkubiert und anschließend pro Minute um ein Grad auf Raumtemperatur herunter gekühlt oder für 5 min in einem kochenden Wasserbad denaturiert und anschließen langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die annealten Oligonukleotide wurden für Klonierungszwecke oder im EMSA (3.15.45) verwendet.

3.15.18. Phosphorylierung

Zur Ligation von Oligonukleotiden in dephosphorylierte Vektoren werden Phosphatreste benötigt. Diese wurden durch die T_4 -Polynukleotidkinase (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) wie folgend angefügt:

Tabelle 6: Ansatz zur Phosphorylierung von annealten Oligonukleotiden

| Komponenten | Volumen [μL] |
|--|---------------------------|
| Annealte Oligonukleotide | 15 |
| 10x Reaktionspuffer A für T_4 -Polynukleotidkinase | 2 |
| 10 mM ATP | 2 |
| T_4 -Polynukleotidkinase | 1 |
| Gesamt | 20 |

Der Ansatz wurde für 40 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei 75 °C hitzeinaktiviert.

3.15.19. Erstellung von Biotin-markierten Oligonukleotiden

Zur Biotin-Markierung wurde das „Biotin 3' End DNA Labeling Kit“ (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) verwendet. Die zu markierenden einzelsträngigen Oligonukleotide wurden auf eine

Konzentration von 1 μM verdünnt und entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die markierten Moleküle wurden anschließend mit dem komplementären Strang annealed (3.15.17) und im EMSA (3.15.45) verwendet.

3.15.20. RNA-Extraktion aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Isolierung von RNA aus pflanzlichem Material wurde das „NucleoSpin RNA Plant“ Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Die Qualitäts- und Quantitätskontrolle erfolgte mittels photometrischer Messung (3.15.16).

3.15.21. Reverse Transkription

Mittels Reverser Transkription kann RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dies erfolgte mit dem „RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis“ Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) unter Verwendung von Oligo(dT) Primern. Die entstandene *first strand* cDNA wurde für Klonierungszwecke verwendet und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.15.22. Isolierung von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Extraktion von genomischer DNA aus *A. thaliana* wurden zwei bis drei Blätter von vier Wochen alten Pflanzen in flüssigem Stickstoff gemörsert. Zu dem Pflanzenmaterial wurden 150 μL vorgewärmter Extraktionspuffer gegeben, gevortext und für 10 min bei $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Danach wurden 30 μL 5 M Kaliumacetat (pH 4,8) hinzugegeben, erneut gevortext und auf Eis für 10 min inkubiert. Die Proben wurden nach der Inkubation für 15 min bei 16000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Überstand wurden 180 μL Isopropanol gegeben, gevortext und erneut für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 μL 70 % Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 40 μL LTE gelöst.

3.15.23. Herstellung und Transformation elektrokompenter Bakterienzellen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Bakterienstämme *E. coli* und *A. tumefaciens* für die Elektroporation eingesetzt. Dazu wurde der jeweilige Stamm auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen. *E. coli* wurde über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, wohingegen *A. tumefaciens* bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 48 h inkubiert wurde. Mit einer entsprechenden Kultur wurden 5 mL dYT Medium angeimpft

und über Nacht bei der entsprechenden Temperatur unter Schütteln kultiviert. Die Vorkultur wurde in 400 mL dYT-Medium überführt und bis zu einer OD_{600} 0,5 – 0,8 inkubiert. Nach Erreichen der entsprechenden Zelldichte wurde die Kultur für 30 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 4 °C und 4000 g für 30 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 400 mL kaltem 10 % Glycerin resuspendiert und erneut zentrifugiert. Diese Schritte wurden mit den Volumen von 200 mL und 10 mL 10 % Glycerin wiederholt. Zuletzt wurde das Pellet in 1 mL 10 % Glycerin resuspendiert und jeweils 50 µL Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Zellen wurden bis zur Verwendung bei – 80 °C gelagert.

Zur Vermehrung von rekombinanten Plasmiden in Bakterienzellen wurde dieses über eine Elektroporation in kompetente Bakterienstämme eingebracht. Ein Aliquot des entsprechenden Stammes wurde dafür auf Eis aufgetaut und mit 1 µL der zu transformierenden DNA (z.B. Ligation) versetzt und für 60 sec inkubiert. Das Bakterien/DNA-Gemisch wurde in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt und bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF transformiert (GenePuls II, BioRad, München, Deutschland). Bei *A. tumefaciens* wurde der Widerstand auf 400 Ω erhöht. Nach der Elektroporation wurden 500 µL SOC-Medium auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation unter Schütteln (30 min *E. coli* bzw. 60 min *A. tumefaciens*) wurden 200 µL bzw. 20 µL auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und entsprechend des Bakterienstammes kultiviert.

3.15.24. Herstellung und Transformation chemisch kompetenten Bakterienzellen

Neben der Elektroporation kann eine chemische Transformation von *E. coli*-Zellen durchgeführt werden. Die Bakterien werden durch $CaCl_2$ kompetent gemacht und durch einen Hitzeschock wird die DNA in die Zellen transformiert.

Zur Herstellung von chemisch kompetenten Zellen wurde der entsprechende Stamm auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit einer Kolonie wurden 3 mL LB-Medium angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C über Nacht inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde eine 50 mL Hauptkultur angeimpft und bis zu einer OD_{600} 0,4 – 0,5 inkubiert. Die Kultur wurde in ein steriles Zentrifugengefäß überführt, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 2000 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 mL eiskaltem 100 mM $CaCl_2$ vorsichtig resuspendiert (nicht vortexen) und erneut auf Eis für 10 min inkubiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und das Pellet in 5 mL eiskaltem 100 mM $CaCl_2$ resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden bei 4 °C gelagert und konnten bis zu 48 h verwendet werden.

Für die Transformation wurden 200 µL kompetente Zellen mit 2 µL der zu transformierenden DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 2 min in einem Wasserbad. Auf die Suspension wurden 800 µL SOC-Medium gegeben und für 30 min bei 37 °C geschüttelt. 20 µL und 200 µL des Ansatzes wurden auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgebracht.

3.15.25. Plasmidpräparation aus *Escherichia coli*

Für Experimente mit rekombinaten Plasmiden werden effektive Methoden zur Präparation von Plasmiden benötigt. Abhängig der gewünschten DNA-Mengen können Plasmide aus kleinen (3 – 5 mL; Mini-Präparation) oder größeren Kulturen (Midi- bzw. Maxi-Präparation) isoliert werden.

In dieser Arbeit wurden Plasmide aus Mini- und Midi-Präparationen isoliert. Wurden Plasmide zur Sequenzierung (3.15.27), Transformation von Petersilien-Protoplasten (3.15.32) oder im Yeast One-Hybrid Screen (3.15.37) verwendet, wurden diese nach Herstellerangaben der folgenden Kits verwendet:

NucleoSpin Plasmid EasyPure Kit für Mini-Präparation

NucleoBond® Xtra Midi EF Kit für Midi-Präparation

Bei allen anderen Plasmidpräparationen wurde ein laborinternes Protokoll verwendet.

Hierfür wurden 3 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für 30 sec pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 100 µL Lösung I durch vortexen gelöst und für 5 min bei RT resuspendiert. Zur Denaturierung der Zellen wurden 200 µL Lösung II hinzugegeben, mehrmals invertiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Zur Neutralisierung wurden 150 µL Lösung III hinzugefügt, mehrmals invertiert und erneut auf Eis für 5 min inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 16000 g wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 300 µL Phenol/Chloroform wurden zugegeben, gevortext und für 5 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit 500 µL 100 % Ethanol versetzt und gevortext. Nach einer Zentrifugation von 15 min wurde das Pellet mit 1 mL 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 5 min zentrifugiert. Nach dem Trocknen des Pellet wurde dieses in 50 µL LTE mit RNase (Endkonzentration 10 µg/mL) gelöst. Die Plasmid-DNA wurde bei – 20 °C gelagert.

3.15.26. Plasmidpräparation aus *Saccharomyces cerevisiae*

Plasmide können aus rekombinanten Hefe-Stämmen durch die Methode der alkalischen Lyse isoliert werden. Dazu wurde die entsprechende Hefekolonie in 100 µL Zellsuspensionspuffer A resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 60 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und dabei oftmals invertiert. Nach der Inkubation wurden 200 µL Denaturierungslösung B hinzugegeben, mehrfach gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150 µL Renaturierungslösung C und mehrmaligem Invertieren wurde die Proben erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Die genomische DNA und Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation bei 16000 *g* für 5 min in einer Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und mit dem zweifachen Volumen 100 % Ethanol gemischt. Die Plasmid-DNA wurde für 10 min bei – 20 °C gefällt und anschließend durch eine Zentrifugation bei 16000 *g* für 15 min pelletiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet mit 200 µL 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 16000 *g* wurde das Ethanol entfernt und das DNA-Pellet getrocknet. Die Plasmide wurden in 15 µL LTE resuspendiert. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei – 20 °C.

3.15.27. Sequenzierung und Analyse von DNA-Molekülen

Zur Überprüfung der Richtigkeit von klonierten Plasmiden oder amplifizierten DNA-Fragmenten aus Analysen in Yeast One-Hybrid Screens wurden diese durch die Firma GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) sequenziert. Die übermittelten Daten wurden mit der Software CLC Main Workbench (CLC Bio, Aarhus, Dänemark) und dem GATCViewer (GATC Biotech, Konstanz, Deutschland) oder den folgenden Internetseiten ausgewertet:

- Reverse Complement:
www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
- Alignments:
multalin.toulouse.inra.fr/multalin
- Translate tool:
web.expasy.org/translate/

Zum Vergleich der Sequenz der klonierten Plasmide bzw. amplifizierten Fragmente wurden diese auf die DNA- und Proteinsequenzen von www.arabidopsis.org oder www.ncbi.nlm.nih.gov bezogen oder eine BLAST Analyse (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) zur Identifizierung von im Yeast One-Hybrid (3.15.39) selektierten Transkriptionsfaktoren durchgeführt.

3.15.28. Klonierung von Reportergerkonstrukten zur Transformationen von Protoplasten

Zur Analyse von *cis*-Elementen wurden verschiedene Reportergerkonstrukte erstellt. Abhängig in welchem Organismus die Untersuchungen vorgenommen wurden, wurden verschiedene Vektoren benutzt. Zur Transformation von Petersilien Protoplasten wurde der Vektor pBT10GUS-d35SLUC (3.13.1, Koschmann *et al.*, 2012) verwendet, wohingegen pBT10-LUC (3.13.2, Wehner *et al.*, 2011) bei der *A. thaliana* Protoplasten Transformation verwendet wurde.

Zur Klonierung der verschiedenen Reportergerkonstrukte wurden die zu untersuchenden *cis*-Sequenzen als Oligonukleotide bestellt, annealt (3.15.17) und phosphoryliert (3.15.18). Die Oligonukleotide wurden erstellt, sodass partielle *SpeI*- und *XbaI*-Schnittstellen durch das Annealing entstanden sind. Das annealte und phosphorylierte Oligonukleotid wurde in den ebenfalls mit *SpeI* und *XbaI* geschnittenen und dephosphorylierten pBT10GUS-d35SLUC Vektor kloniert. Zur Überprüfung der Klonierung wurde eine Kolonie-PCR (3.15.11) mit den Primern MS23 GUS-LUC-4301.f (7445; Anhang 9.2) und MS23 GUS-LUC-4826-r (7446; Anhang 9.2) durchgeführt. Zur weiteren Überprüfung auf eine erfolgreiche Klonierung wurde eine Sequenzierung (3.15.27) mit dem Primer GUS75 (7346; Anhang 9.2) durchgeführt. Für eine Tetramerisierung der zu analysierenden *cis*-Elemente wurden zwei verschiedene Restriktionsansätze der positiven Konstrukte durchgeführt. Aus einem Restriktionsansatz (3.15.14) mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *SacI* wurde ein ca. 2 kb großes Vektorfragment aus einem Agarosegel isoliert (3.15.12 und 3.15.13), wohingegen aus einem Restriktionsansatz (3.15.14) mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *SacI* ein ca. 5 kb großes Fragment aufgereinigt wurde. Durch eine Ligation (3.15.15) beider Fragmente entstand ein Dimer des zu untersuchenden *cis*-Elements in dem Vektor pBT10GUS-d35SLUC. Dieses Vorgehen wurde mit den Dimer-Konstrukten wiederholt, sodass Tetramere der *cis*-Sequenzen im Vektor pBT10GUS-d35SLUC erstellt wurden. Der Erfolg der Klonierung wurde durch eine Sequenzierung (3.15.27) mit dem Primer GUS75 (7346; Anhang 9.2) überprüft. In Abbildung 16 ist die Tetramerisierung der *cis*-Sequenzen grafisch dargestellt.

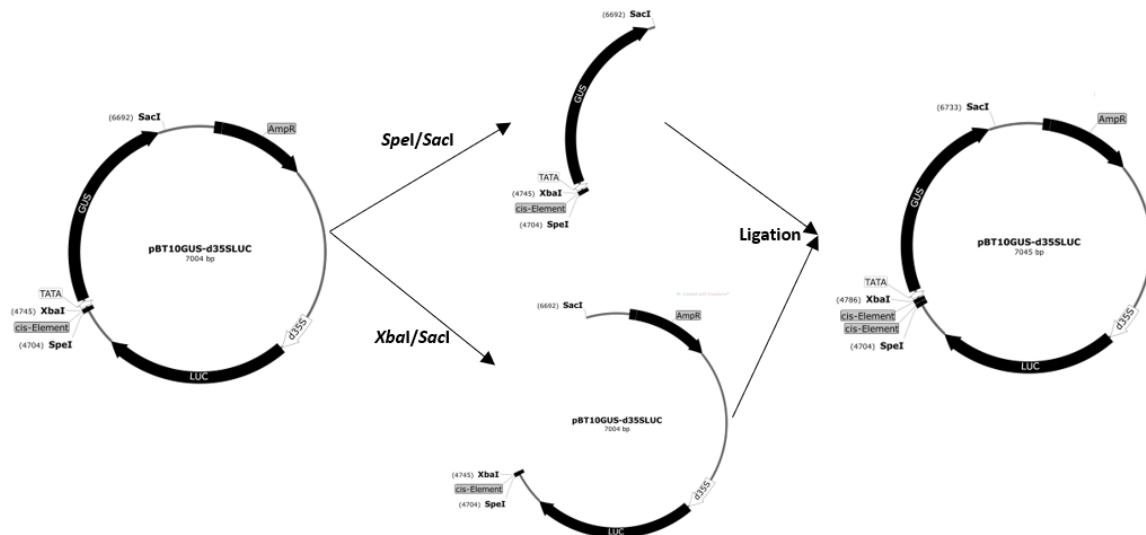


Abbildung 16: Tetramerisierung der cis-Elemente im Vektor pBT10GUS-d35SLUC

Zur Tetramerisierung von cis-Sequenzen im Vektor pBT10GUS-d35SLUC wurden zwei Restriktionsspaltungen mit den Restriktionsenzymen *SpeI* bzw. *XbaI* und *SacI* durchgeführt. Anschließend wurde das ca. 2 kb große Fragment aus der *SpeI/SacI*-Spaltung und das ca. 5 kb große Fragment der *XbaI/SacI*-Spaltung aufgereinigt und miteinander ligiert. Dabei entsteht ein Dimer des cis-Elements im pBT10GUS-d35SLUC Vektor. Dieses Vorgehen wurde zur Erstellung von Tetrameren wiederholt.

Zur Analyse auf MAMP-Responsivität der cis-Elemente in *A. thaliana* Protoplasten wurden die zu untersuchenden Sequenzen in den Vektor pBT10-LUC kloniert. Dazu wurden die bestehenden Tetramere im Vektor pBT10GUS-d35SLUC mit den Primern EMSA f (7249; Anhang 9.2) und EMSA r (7250; Anhang 9.2) in einer PCR (3.15.11) amplifiziert und mit dem Kit „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up“ (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Das aufgereinigte PCR-Produkt und der Vektor pBT10-LUC wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XbaI* gespalten (3.15.14), in einem Agarosegel aufgetrennt (3.15.12), erneut aufgereinigt (3.15.13) und ligiert (3.15.15). Der Erfolg der Klonierung wurde durch eine Sequenzierung (3.15.27) mit dem Primer pBT10-LUC_1794 f (7251; Anhang 9.2) kontrolliert.

Von allen erstellten Konstrukten wurde eine Dauerkultur erstellt (3.15.4). Eine Auflistung befindet sich im Anhang unter 9.1.

3.15.29. Klonierung von Reportergenkonstrukten für Yeast One-Hybrid Screens

Zur Analyse von cis-Sequenzen im Yeast One-Hybrid System (3.15.38 und 3.15.39) wurden die Tetramere der zu untersuchenden cis-Elemente in den Vektor pHIS2.1 (3.13.4) kloniert. Die Tetramere im Vektor pBT10GUS-d35SLUC wurden durch die Primer Bait_right (6419; Anhang 9.2) und Bait_left (6420; Anhang 9.2) in einer PCR (3.15.11) mit den Schnittstellen für *EcoRI* und *SacI* amplifiziert. Das PCR-Produkt und der Vektor pHIS2.1 wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen gespalten

(3.15.14), aufgereinigt (3.15.13) und miteinander ligiert (3.15.15). Die klonierten Vektoren wurden durch Sequenzierung (3.15.27) mit dem Primer pHis_right (5122; Anhang 9.2) kontrolliert.

Von den verschiedenen Konstrukten wurde jeweils eine Dauerkultur (3.15.4) erstellt und eine Auflistung befindet sich unter 9.1 im Anhang.

3.15.30. Klonierung von T-DNA Konstrukten zur Überexpression von Transkriptionsfaktoren

Zur Überexpression von Transkriptionsfaktoren in pflanzlichen Protoplasten wurde der modifizierte T-DNA Vektor pORE-O2-d35S-pA (pORE) (3.13.6) verwendet (Coutu *et al.*, 2007; Machens *et al.*, 2014).

Zur Klonierung der verschiedenen Transkriptionsfaktoren wurde im ersten Schritt RNA aus Blättern von *A. thaliana* Pflanzen isoliert (3.15.20) und in cDNA umgeschrieben (3.15.21). Die erstellte cDNA wurde als Template in den verschiedenen PCR-Ansätzen (3.15.11) verwendet sowie zur Amplifikation der gewünschten Transkriptionsfaktoren.

Zur Klonierung von *WRKY26* in pORE wurde eine PCR (3.15.11) mit den Primern AtWRKY26 F (7095; Anhang 9.2) und AtWRKY26 R (7096; Anhang 9.2) und cDNA aus *A. thaliana* durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde über die Schnittstellen *Bam*HI und *Kpn*I in den pORE Vektor kloniert.

Der Transkriptionsfaktor *WRKY40* wurde mit den Primern AtWRKY40 F (7091; Anhang 9.2) und AtWRKY40 R (7092; Anhang 9.2) amplifiziert und über die Schnittstellen *Bam*HI und *Kpn*I in den T-DNA Vektor pORE kloniert.

WRKY41 wurde mit den Primern AtWRKY41 F (7093; Anhang 9.2) und AtWRKY41 R (7094; Anhang 9.2) amplifiziert und über die Schnittstellen *Sac*I und *Kpn*I in das Plasmid pORE kloniert.

Zur Umwandlung der Transkriptionsfaktoren *WRKY26* und *WRKY41* in Aktivatoren wurde N-terminal an die Transkriptionsfaktoren das Fusionskonstrukt des Vektors pGADT7AD (3.13.5) aus dem Zellkernlokalisierungssignal aus SV40 und der Aktivierungsdomäne des Hefefaktors GAL4 kloniert. Die entsprechenden Konstrukte werden als *WRKY26AD* und *WRKY41AD* bezeichnet.

Zur Klonierung von *WRKY26AD* wurde eine PCR (3.15.11) mit den Primern *WRKY26_Bam*HI_f (7573; Anhang 9.2) sowie *WRKY26_Kpn*I_r (7574; Anhang 9.2) durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Kpn*I in den Vektor pORE kloniert. Zur N-terminalen Klonierung der Aktivierungsdomäne von GAL4 wurde eine PCR (3.15.11) mit den Primern *Gal4AD_Xba*I_f (7366; Anhang 9.2) und *Gal4AD_Bam*HI_r (7367; Anhang 9.2) und dem Vektor pGADT7AD (Clontech, Saint-

Germain-en-Laye, France) als Template durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsenzyme *Xba*I und *Bam*HI in den zuvor erstellten Vektor WRKY26-pORE kloniert.

Der Vektor WRKY41AD-pORE wurde erstellt, indem eine PCR mit den Primern WRKY41_*Sac*I_f (7571; Anhang 9.2) und WRKY41_*Kpn*I_r (7571; Anhang 9.2) durchgeführt wurde. Das Amplifikat wurde über die Restriktionsenzyme *Sac*I und *Kpn*I in den Vektor pORE kloniert. Zur N-terminalen Fusion der Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors GAL4 wurde eine PCR (3.15.11) mit den Primern Gal4AD_*Xba*I_f (7366; Anhang 9.2) und Gal4AD_*Sac*I_r (7570; Anhang 9.2) ausgehend vom pGADT7AD Vektor (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Sac*I in den zuvor erstellten Vektor WRKY41-pORE kloniert.

Zur Klonierung des murinen Transkriptionsfaktor NF- κ B p65 in den pflanzlichen Expressionsvektor pORE wurde RNA von der Fibroblastenzelllinie NIH 3T3 von Christopher Eickhorst und Kazuhiko Namikawa aus der Arbeitsgruppe Köster der TU Braunschweig erhalten. Diese RNA wurde in cDNA umgeschrieben (3.15.21). Die cDNA von p65 wurde in einer PCR (3.15.11) mit den Primern p65_*Eco*RI_f (7372; Anhang 9.2) und p65_*Sall*_r (7461; Anhang 9.2) amplifiziert und über die Schnittstellen *Eco*RI und *Sall* in den pORE Vektor kloniert.

Zur Erstellung von verschiedenen NF- κ B p65 Fusionsproteinen, die N-terminal das Zellkernlokalisierungssignal von SV40 und bzw. oder die Aktivierungsdomäne des Hefetranskriptionsfaktor Gal4 tragen, wurden verschiedene Klonierungen durchgeführt.

Zur Erstellung des rekombinanten Proteins, das N-terminal das Zellkernlokalisierungssignal von SV40 und die zusätzliche Aktivierungsdomäne von Gal4 trägt, wurde die cDNA von p65 in einer PCR (3.15.11) mit den Primern p65_*Eco*RI_f (7372; Anhang 9.2) und p65_*Xho*I_r (7373; Anhang 9.2) amplifiziert und über die Schnittstellen *Eco*RI und *Xho*I in den Yeast One-Hybrid Vektor GADT7AD (3.13.5) kloniert. Dieses Vektorkonstrukt wurde als Template für eine weitere PCR (3.15.11) mit den Primern Gal4AD_*Xba*I_for (7366; Anhang 9.2) und p65_*Sall*_r (7461; Anhang 9.2) verwendet und das erhaltene PCR-Produkt wurde über die Schnittstellen *Xba*I und *Sall* in den pORE Vektor kloniert. Das erstellte rekombinante Konstrukt wird als SV40-Gal4AD-p65-pORE bezeichnet.

Zur Erstellung des Fusionsproteins aus dem Zellkernlokalisierungssignal des SV40 und dem NF- κ B p65 Transkriptionsfaktor wurde eine PCR (3.15.11) mit den Primern Gal4AD_*Xba*I_for (7366; Anhang 9.2) und SV40_*Eco*RI_rev (7455; Anhang 9.2) mit dem Vektor pGADT7AD als Template zur Amplifikation des Zellkernlokalisierungssignals durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Eco*RI in den Vektor p65-pORE kloniert. Das erstellte Konstrukt wird als SV40-p65-pORE bezeichnet.

Zur Klonierung des rekombinanten Proteins aus der Aktivierungsdomäne von Gal4 und dem Transkriptionsfaktor NF- κ B p65 wurde eine PCR (3.15.11) mit den Primern Gal4AD_ATG_XbaI_f (7500; Anhang 9.2) und Gal4AD_EcoRI_r (7501; Anhang 9.2), sowie pGADT7AD als Template durchgeführt. Das Amplifikat wurde über die Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *EcoRI* in den Vektor p65-pORE kloniert. Das entstandene Fusionsprotein wird als Gal4AD-p65-pORE bezeichnet.

Zur Erstellung von stabil transformierten *A. thaliana* Pflanzen, in denen die Expression des rekombinanten NF- κ B p65 durch das Hormon β -Estradiol induziert werden kann, wurde der Transkriptionsfaktor p65 in den pflanzlichen Expressionsvektor UBQ10_sXVE_HA_Bar (3.13.9) kloniert. Dazu wurde die cDNA von p65 mit den Primern p65_XbaI_f (7462; Anhang 9.2) und p65_oStop_XhoI_r (7495; Anhang 9.2) in einer PCR (3.15.11) amplifiziert und über die Schnittstellen *XbaI* und *XhoI* in den Vektor UBQ10_sXVE_HA_Bar kloniert.

Alle erstellten Konstrukte wurden durch Sequenzierung (3.15.27) überprüft und eine Dauerkultur erstellt (3.15.4). Im Anhang unter 9.1 befindet sich eine Auflistung der erstellten Konstrukte.

3.15.31. Klonierung von Konstrukten zur Expression und Aufreinigung in *Escherichia coli*

Zur Proteinüberexpression in *E. coli* wurde das pQE-Vektorsystem von Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet (3.13.7). Durch das Vektorsystem wird N-Terminal ein His-Tag an das zu exprimierende Protein angefügt, wodurch eine Aufreinigung des rekombinanten Proteins ermöglicht wird. Die Expression kann durch die Zugabe von IPTG im Bakterium induziert werden.

Zur Überexpression des murinen NF- κ B p65 wurde die cDNA in den Vektor pQE-31 kloniert. Dazu wurde eine PCR (3.15.11) mit den Primern p65_SalI_f (7499; Anhang 9.2) und p65_HindIII_r (7460; Anhang 9.2) und dem Vektor p65-pORE (4934) als Template durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt (3.15.13), mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *HindIII* gespalten (3.15.14) und in den ebenfalls mit *SalI* und *HindIII* gespaltenen pQE-31 Vektor ligiert (3.15.15). Der Erfolg der Klonierung wurde durch eine Sequenzierung (3.15.27) überprüft und eine Dauerkultur erstellt (3.15.4).

Zur Überexpression des pflanzlichen WRKY26 wurde die cDNA in den Vektor pQE-32 kloniert. Dazu wurde eine Restriktionsspaltung des Vektors WRKY26-pORE (4648) mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *KpnI* durchgeführt (3.15.14) und die cDNA in den ebenfalls mit *BamHI* und *KpnI* gespaltenen pQE-32 Vektor ligiert (3.15.15). Der Erfolg der Klonierung wurde durch eine Sequenzierung (3.15.27) überprüft und eine Dauerkultur erstellt (3.15.4).

3.15.32. Isolierung und Transformation von Petersilienprotoplasten

Die Isolierung und Transformation von Petersilienprotoplasten erfolgte nach Koschmann *et al.* (2012) und Kanofsky *et al.* (2016). Alle Arbeiten bis zur Ente der transformierten Protoplasten erfolgte unter der Sterilwerkbank. Beim Pipettieren von Protoplasten wurden abgeschnittene Spitzen verwendet. Die Zentrifugationsschritte erfolgten im Ausschwingrotor der Heraeus Varifuge 3.0.

Die Kultivierung der Zellkultur erfolgte nach 3.15.9. Zur Isolierung von Protoplasten wurde eine 5 Tage alte Kultur auf zwei 50 mL Falkons aufgeteilt und für 5 min bei 3000 *g* abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Auf die jeweiligen Zellpellets wurden 15 mL Enzymlösung (3.2.10) gegeben, mit CaCl_2 -Lösung auf 45 mL aufgefüllt und in 150 mm Petrischalen überführt. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und für 20 h bei 15 rpm (Celloshaker Variospeed) in Dunkelheit bei 23 °C inkubiert. Am Ende wurde die Drehzahl für 20 min auf 40 rpm erhöht. Jede Suspension wurde mit einer 3 mL Transferpipette in jeweils ein 50 mL Falcon überführt und anschließend für 2 min bei 300 *g* zentrifugiert. Nach vorsichtiger Entfernung des Überstands wurde mit CaCl_2 -Lösung auf 30 mL aufgefüllt und das Pellet resuspendiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt. Die jeweiligen Pellets wurden in 25 mL P5-Medium resuspendiert und in ein 50 mL Falcon vereinigt. Nach einer Zentrifugation bei 300 *g* für 5 min flottieren die intakten Protoplasten als Ring an der Oberfläche der Suspension. Dieser Ring wurde vorsichtig mit einer 3 mL Transferpipette in ein neues 50 mL Falcon überführt und mit P5-Medium auf 50 mL aufgefüllt. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die flottierten Protoplasten in zwei 15 mL Falkons aufgeteilt und entsprechend auf 15 mL mit P5-Medium aufgefüllt. Die Zentrifugation wurde wiederholt und die flottierten Protoplasten in ein 15 mL Falcon vereinigt. Diese wurden wieder auf 15 mL mit P5-Medium aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Die flottierten Protoplasten wurden in ein neues 15 mL Falcon überführt und konnten transformiert werden.

Zur Transformation von Petersilienprotoplasten wurden in einem 15 mL Falcon 20 μL Plasmid-DNA ($c = 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) und 200 μL PEG-Lösung gemischt. Bei Untersuchungen von Elicitor-Responsivität von Promotoren wurden entsprechende pBT10GUS-d35SLUC Vektorkonstrukte verwendet, bei Analysen von Transkriptionsfaktor-vermittelten Reportergenexpressionen wurden hingegen Kotransformationen durchgeführt. Hierfür wurden die entsprechenden Expressionsvektoren (pORE-d35S-pA-Konstrukte) und das Reporterplasmid (pBT10GUS-d35SLUC) im Verhältnis 1:4 (5 μL + 15 μL) vermengt. Durch Zugabe von 200 μL Protoplasten zum DNA/PEG-Mix wurde die Transformation gestartet und alles vorsichtig vermischt. Die Transformation erfolgte für 20 min im Dunklen und durch Zugabe von 5 mL $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung abgestoppt. Bei mehreren Ansätzen wurde in einem 30 Sekunden-Takt transformiert und abgestoppt. Nach mehrmaligem Invertieren wurden die Protoplasten durch eine Zentrifugation bei 150 *g* für 7 min pelletiert. Die Pellets wurden in 6 mL P5-Medium vorsichtig

resuspendiert und 3,2 mL in ein neues 15 mL Falcon überführt. Bei Untersuchungen von Pep25-Responsivität der verschiedenen Reportergenkonstrukten wurden in die überführte Suspension 9 µL Pep25-Lösung hinzugegeben (Endkonzentration 300 ng/mL).

Nach einer 24 h Inkubation in Dunkelheit und bei 23 °C wurden die Protoplasten geerntet. Hierfür wurden die entsprechenden Falkons auf 12 mL mit CaCl₂-Lösung aufgefüllt, invertiert und für 10 min bei 1400 g zentrifugiert. Mit einer Wasserstrahlpumpe wurde der Überstand bis auf 1 mL abgesaugt. Das Pellet wurde in dem verbleibendem Milliliter resuspendiert und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß übertragen. Nach einer Zentrifugation für 30 sec bei 16000 g in einer Tischzentrifuge wurde der restliche Überstand entfernt und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Pellets wurden bei – 80 °C gelagert.

Zur Bestimmung der LUC- und GUS-Aktivität wurden die Proteine aus den transformierten Protoplasten isoliert. Dazu wurden die Proben mit geöffneten Deckeln für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend in 150 µL LUC-Extraktionspuffer resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension für 20 min bei 4 °C geschüttelt (Mixer 5432, Eppendorf). Die Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation bei 25000 g für 10 min bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Proteinkonzentration wurde nach 3.15.34 bestimmt und jeweils 200 µL der Proteinlösung mit einer Konzentration von 80 µg/mL hergestellt. Diese Proteinlösung wurde zur Messung der LUC- und GUS-Aktivität (3.15.35 bzw. 3.15.36) verwendet.

3.15.33. Isolierung und Transformation von *Arabidopsis thaliana* Protoplasten

Zur Isolierung von *A. thaliana* Mesophyll-Protoplasten wurde eine modifizierte Tape-Sandwich Methode nach Wu *et al.* (2009) verwendet. Es wurden Pflanzen des Ökotyps Col-0 verwendet, die 4 bis 6 Wochen unter Langtagbedingungen angezogen wurden und noch keine Blütenstände entwickelt hatten. Die Protoplasten wurden nach einer modifizierten PEG Methode nach Yoo *et al.* (2007) transformiert.

Zur Isolierung der Protoplasten wurden ca. 20 Blätter verwendet. Die obere Epidermis wurde auf Time Tape (Precision Dynamics Corp., Valancia, Kalifornien) fixiert und auf die untere Epidermis wurde vorsichtig Magic Tape (3M France, Cergy Pontoise Cedex, Frankreich) gedrückt. Durch achtsames Abziehen des Magic Tape wurde die untere Kutikula entfernt und die am Time Tape freiliegenden Mesophyll-Zellen nach unten in eine Petrischale mit 15 mL Enzymlösung (3.2.11) gelegt. Die Petrischale

mit dem pflanzlichen Gewebe wurde für 1,5 h bei Raumtemperatur in Dunkelheit zur Protoplastenfreisetzung leicht geschwenkt.

Um eine Adhäsion der Protoplasten an die verwendeten Plastikgefäße zu verhindern, wurde das verwendete Rundbogenzentrifugenröhrchen, die 6 Well Zellkulturplatten und die 2 mL Reaktionsgefäße für einige Sekunden mit 1 % (w/v) BSA gecoatet.

Zur Reinigung der Isolierten Protoplasten wurden diese durch ein Nylonsieb mit 60 μM Maschenweite filtriert. Dazu wurde das Nylongewebe in einen Trichter gesetzt und mit W5-Lösung equilibriert. Anschließend wurde die Protoplastensuspension mit einer Transferpipette auf das Nylongewebe gegeben und die gefilterten Protoplasten in einem Rundbogengefäß aufgefangen. Die Petrischale wurde erneut mit etwa 5 mL W5-Lösung ausgespült und ebenfalls durch das Nylongewebe gefiltert. Die Protoplasten wurden für 2 min bei 100 g in der GS-6KR Zentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und die Protoplasten in 25 mL W5-Lösung resuspendiert. Die Zentrifugation und der Waschschrift wurden erneut wiederholt. Die Protoplasten wurden in 1 mL W5-Lösung resuspendiert und die Protoplastenkonzentration mittels Thomakammer bestimmt. Mit der W5-Lösung wurde eine Konzentration von $5 \cdot 10^5$ Protoplasten/mL eingestellt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand vorsichtig entfernt und die Protoplasten im gleichen Volumen mit MMg-Lösung resuspendiert.

Zur Untersuchung der Elicitor-Responsivität von synthetischen Promotoren wurden 200 μL der zu transformierenden Mesophyll-Protoplasten mit 20 μL eines 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ DNA-Gemisches versetzt. Das Gemisch bestand zu drei Teilen aus den Promotor-Reporterplasmiden (verschiedene pBT10-LUC Konstrukte; 15 μL) und zu einem Teil aus der Transformationskontrolle (pRT103-GUS; 5 μL). Die Transformation wurde durch Zugabe von 220 μL 30 % PEG-Lösung und vorsichtiges Mischen gestartet. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurde die Transformation durch Zugabe von W5-Lösung auf 2 mL und vorsichtiges Invertieren abgestoppt. Die Protoplasten wurden bei 100 g für 2 min pelletiert und zweimal mit W5-Lösung gewaschen, anschließend in 2 mL B5-Medium resuspendiert und auf 2 Wells einer 6-Well Zellkulturplatte aufgeteilt. Zur Elicitor-Behandlung wurde jeweils eines der Wells mit 10 μL 100 μM flg22 versetzt und vorsichtig durch leichtes Schwenken gemischt. Die Zellkulturplatten wurden mit Leukopor verschlossen und für 4 h in Dunkelheit inkubiert.

Zur Untersuchung des Einflusses von Transkriptionsfaktoren auf die Reportergenexpression wurden 200 μL der Protoplasten Lösung mit 20 μL eines 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ DNA-Gemisches versetzt. Das Gemisch bestand zu zwei Teilen aus den Promotor-Reporterplasmiden (verschiedene pBT10-LUC Konstrukte; 10 μL), zu einem Teil aus der Transformationskontrolle (pRT103-GUS; 5 μL) und zu einem Teil aus den Transkriptionsfaktor-Vektoren (verschiedene pORE Vektoren; 5 μL). Die Transformation wurde durch

Zugabe von 220 μL 30 % PEG-Lösung und vorsichtiges Mischen gestartet. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurde die Transformation durch Zugabe von W5-Lösung auf 2 mL und vorsichtiges Invertieren abgestoppt. Die Protoplasten wurden bei 100 g für 2 min pelletiert und zweimal mit W5-Lösung gewaschen, anschließend in 1 mL B5-Medium resuspendiert und in ein Well einer 6-Well Zellkulturplatte überführt. Die Zellkulturplatten wurden mit Leukopor verschlossen und über Nacht in Dunkelheit inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Protoplasten aus den Zellkulturplatten in 2 mL Reaktionsgefäße überführt, die entsprechenden Wells mit 1 mL W5-Lösung ausgespült und ebenfalls in das Reaktionsgefäß übertragen. Nach einer Zentrifugation für 2 min bei 200 g wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Pellets wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Zur Bestimmung der LUC- und GUS-Aktivität wurden die Pellets mit 150 μL 1x Cell Culture Lysis Reagenz (Promega, Mannheim, Deutschland) versetzt und sehr vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis wurden die Zelltrümmer bei 16000 g für 2 min in einer Tischzentrifuge pelletiert. Der Proteinüberstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und bis zur LUC- bzw. GUS-Messung (3.15.35 bzw. 3.15.36) auf Eis gelagert.

3.15.34. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde nach Bradford (1976) durchgeführt. Die Methode beruht auf den verschiedenen Absorptionszuständen von Coomassie Brilliant Blue G250. Der Farbstoff bindet an basische Aminosäuren, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 470 nm zu 595 nm verschiebt. Die Veränderung der Absorption ist dabei proportional zur Proteinkonzentration, daher können die spektroskopischen Daten zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet werden.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von transformierten Petersilienprotoplasten wurde eine 1:10-Verdünnung der entsprechenden Proben hergestellt, indem 30 μL der Proteinlösung (3.15.32) mit 270 μL ddH₂O gemischt wurden. Von jeder Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, indem 50 μL der verdünnten Proteine jeweils in ein Well einer durchsichtigen 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert wurden. Zu jeder Probe wurden 200 μL Bradford-Arbeitslösung hinzugegeben und für 5 min in Dunkelheit inkubiert. Als Blank wurden 50 μL LUC-Extraktionspuffer mit Bradford-Arbeitslösung verwendet. Die Proben wurden im TriStar LB 941 bei 590 nm (0,1 sec pro Well; Lampenenergie 13000) vermessen. Die Messwerte wurden automatisch von dem Blank korrigiert. Zur Bestimmung der Konzentration wurde eine Regressionsgerade von 0 – 100 $\mu\text{g/mL}$ BSA verwendet. Bei Verwendung

einer neuen Halogenlampe des TriStar LB 941 oder neuem 5x Roti-Quant Reagenz wurde eine neue Regressionsgerade erstellt.

Zur Bestimmung der Konzentration von Proteinextrakten (z.B. Proteinaufreinigungen aus *E. coli*-Überexpressionen (3.15.43)) wurde grundsätzlich eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zur Vermessung wurden 5 – 20 µL Proteinextrakt mit 1x Roti-Quant Reagenz auf ein Gesamtvolumen von 1 mL versetzt und gemischt. Als Blank diente das gleiche Volumen mit entsprechendem Extraktionspuffer. Die Proben wurden für 5 min in Dunkelheit inkubiert und bei 595 nm vermessen. Zur Berechnung der Konzentration wurde ebenfalls eine Standardreihe verwendet. Dazu wurden Konzentrationen von 1,25 – 10 µg/µL BSA in Probenpuffer erstellt, wie oben beschrieben vermessen und eine Regressionsgerade erstellt.

3.15.35. Luciferase-Assay

Das Reporterenzym Luciferase (LUC) setzt das Substrat D-Luciferin mit Hilfe von ATP und Magnesium-Ionen zu einem Anhydrid um, welches mit Sauerstoff zu einem Peroxyd reagiert. Nach Abspaltung von AMP entsteht ein instabiler Dioxetanon-Ring. Dieser zerfällt zu Kohlenstoff und Oxyluciferin. Dabei fallen angeregte Elektronen des Oxyluciferins in den Grundzustand zurück, wobei Photonen emittiert werden. Die Emission kann bei einer Wellenlänge von etwa 575 – 600 nm gemessen werden.

Die LUC-Aktivität von transformierten Petersilienprotoplasten wurde aus den unter 3.15.32 beschriebenen Proteinextrakten bestimmt. Die Messung wurde in einer Doppelbestimmung durchgeführt. Dazu wurden 50 µL der Proteinlösung (4 µg Protein) in jeweils ein Well einer weißen Mikrotiterplatte pipettiert. Als Blank wurden 50 µL des LUC-Extraktionspuffer verwendet. Die Messung der LUC-Aktivität erfolgte im TriStar LB 941. Über den Injektor wurden einmal 175 µL LUC-Reaktionspuffer sowie 50 µL Luciferin-Substratlösung zu den Proben gegeben und die Lumineszenz über 15 sec gemessen (Messintervall 0,1 sec). Zur Bestimmung der Reporterogenaktivitäten wurden die Integrale der gemessenen Werte um den Blank korrigiert und durch den Faktor 3529052500 (bei der Etablierung des Assays war der Faktor der höchste gemessene Wert und wird im Labor zur Normalisierung verwendet) geteilt. Die Aktivität wurde in RLU/sec/mg Protein berechnet und diente als Maß für die Transformationseffizienz und wurde zur Normalisierung der GUS-Aktivität (3.15.36) von transformierten Plasmiden in Petersilienzellen verwendet.

Zur Bestimmung der Reporterogenaktivität aus transformierten *A. thaliana* Protoplasten wurden je 20 µL des Proteinüberstandes (siehe 3.15.33) in jeweils ein Well einer weißen Mikrotiterplatte pipettiert. Als Blank wurden 20 µL 1x Cell Culture Lysis Reagent (Promega, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Messung der LUC-Aktivität erfolgte im TriStar LB 941, indem 100 µL Luciferase Assay

Reagent (Promega, Mannheim, Deutschland) in die Wells injiziert und die Lumineszenz für 15 sec im Messintervall 0,1 sec gemessen wurden. Das Integral der Messwerte wurde um den Blank korrigiert und für die Bestimmung der LUC-Aktivität verwendet. Dazu wurden die LUC-Werte der mit bzw. ohne Elicitor behandelten Protoplasten durch den entsprechenden GUS-Wert ($\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1}$) (3.15.36) der unbehandelten Protoplasten geteilt. Die Zugabe von Elicitor reduziert unabhängig der Transformationseffizienz die GUS-Aktivität, deshalb wurden zur Berechnung der normierten LUC-Aktivitäten nur die unbehandelten GUS-Werte verwendet. Da die beiden Proben aus derselben Transformation stammen, ist diese Berechnung möglich. Zur Berechnung der Induktionsfaktoren bei Kotransformationsexperimenten wurde die Reportergenaktivität in Anwesenheit des entsprechenden Transkriptionsfaktors durch die Reportergenaktivität ohne diesen geteilt.

Zur Darstellung der Ergebnisse der normierten LUC-Aktivitäten der transformierten *A. thaliana* Protoplasten wurden Diagramme aus den Mittelwerten der Reportergenaktivitäten mit entsprechenden Standardabweichungen erstellt. Um signifikante Unterschiede in zwischen den verschiedenen Proben zu bestimmen, wurde in Excel ein ungepaarter *t*-Test mit unterschiedlicher Varianz durchgeführt. Werte mit einem $p \leq 0,05$ zeigen einen signifikanten Unterschied auf. Dies wurde mit * gekennzeichnet. p -Werte $\leq 0,01$ geben einen sehr signifikanten Unterschied an. Dies wurde mit ** gekennzeichnet. Werte mit einem $p \leq 0,001$ zeigen einen hoch signifikanten Unterschied, der mit *** gekennzeichnet wurde.

3.15.36. β -Glucuronidase-Assay

Die β -Glucuronidase (GUS) katalysiert unter anderem die Umsetzung von 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (4-MUG) in 4-Methylumbelliferon (4-MU). Bei einer quantitativen GUS-Messung wird die Zunahme des Produktes über die Zeit gemessen. Das fluoreszierende 4-MU kann bei einer Wellenlänge von 360 nm angeregt und eine Emission bei einer Wellenlänge von 460 nm detektiert werden. Anhand einer Regressionsgeraden mit steigender 4-MU-Konzentration kann von der gemessenen Fluoreszenz über den Zeitraum ($\Delta \text{FU pro Zeit}$) auf die gebildete Produktmenge (pmol 4-MU pro min) geschlossen werden. Die Fluoreszenzmessung erfolgte im TriStar LB 941 bei 37 °C und einer Lampenintensität von 6000. Die GUS-Aktivität wird in $\text{pmol 4-MU/min/mg Protein}$ berechnet.

Zur Bestimmung der GUS-Aktivität aus transformierten Petersilienprotoplasten wurde im Vorfeld eine Proteinextraktion (3.15.32) und LUC-Messung (3.15.35) durchgeführt. Jede Probe im Assay wurde einer Doppelbestimmung unterzogen. Dabei wurden jeweils 25 μL der Proteinlösung (2 $\mu\text{g Protein}$) in ein Well einer schwarzen Mikrotiterplatte pipettiert. Zu jeder Probe wurden 225 μL GUS-

Reaktionspuffer hinzugegeben. Im TriStar LB 941 wurde die Fluoreszenz über 3 Stunden zwölfmal in einem Intervall von 15 min für 1 sec vermessen.

Die GUS-Aktivität der Proben wurde durch den entsprechenden normierten LUC-Wert (3.15.35) geteilt. Bei Untersuchungen von Pep25-responsiven Promotorbereichen wurde der LUC-Wert der unbehandelten Pep25 Protoplasten verwendet, da der Elicitor einen negativen Einfluss auf die LUC-Aktivität unabhängig der Transformation ausweist. Dieser Vorgang ist möglich, da die Protoplasten aus demselben Transformationsansatz stammen. Die Ergebnisse wurden in einem Diagramm aus den Mittelwerten der normierten GUS-Aktivitäten mit entsprechenden Standardabweichungen dargestellt. Zur Berechnung der Induktionsfaktoren bei Kotransformationsexperimenten wurde die Reportergenaktivität in Anwesenheit des entsprechenden Transkriptionsfaktors durch die Reportergenaktivität ohne diesen geteilt. Zur Überprüfung von signifikanten Unterschieden der normierten GUS-Werte wurde in Excel ein ungepaarter *t*-Test mit unterschiedlicher Varianz durchgeführt. Werte mit einem $p \leq 0,05$ zeigen einen signifikanten Unterschied auf. Dies wurde mit * gekennzeichnet. p -Werte $\leq 0,01$ geben einen sehr signifikanten (**) Unterschied an. Werte mit einem $p \leq 0,001$ zeigen einen hoch signifikanten (***) Unterschied.

Die GUS-Aktivität von transformierten *A. thaliana* Protoplasten wurde ebenfalls nach der Messung der LUC-Aktivitäten (3.15.35) der entsprechenden Proben durchgeführt. Die Proben wurden in einer Doppelbestimmung vermessen. Dazu wurden jeweils 25 μL der Proben in ein Well einer schwarzen Mikrotiterplatte pipettiert und mit 225 μL GUS-Reaktionspuffer versetzt. Im TriStar LB 941 wurde die Fluoreszenz über 1 Stunden zwölfmal in einem Intervall von 5 min für 1 sec detektiert.

3.15.37. Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Transformation von Plasmiden in *S. cerevisiae* wurde der entsprechende Hefestamm auf entsprechendem Medium ausplattiert und kultiviert (3.15.3). Eine große Hefekolonie wurde in 1 mL ddH₂O resuspendiert und für 30 sec pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und folgender Transformationsansatz auf das Pellet gegeben:

| | |
|-------------------|--|
| 240 μL | 50 % PEG 3350 |
| 36 μL | 1 M Lithiumacetat, pH 7,0 |
| 50 μL | 2 mg/mL Carrier-DNA (5 min bei 95 °C aufgeköcht, danach auf Eis) |
| 34 μL | 1 μg Plasmid DNA |

Das Hefepellet wurde in dem Ansatz resuspendiert und für 1 bis 3 h bei 42 °C in einem Wasserbad inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 30 sec wurde der Überstand verworfen und die

transformierten Hefezellen in 500 μL ddH₂O resuspendiert. 100 μL der Suspension wurden auf entsprechenden Medien ausplattiert und für 3 bis 5 Tage bei 30 °C kultiviert.

3.15.38. Erstellung und Analyse eines Bait-Stammes für einen Yeast One-Hybrid Screen

Für eine Analyse einer Interaktion zwischen einem Protein und DNA kann ein Yeast One-Hybrid Screen in Hefezellen durchgeführt werden. Dafür wurde ein Bait-Stamm erstellt, der das zu untersuchende Promotorfragment trägt. Nach 3.15.29 wurde der Bait-Vektor kloniert und nach 3.15.37 in den Y1H-Gold Hefestamm (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) transformiert. Zur Bestimmung der Hintergrundaktivität des Promotors wurden jeweils zwei Kolonien auf entsprechendes Selektionsmedium ausgebracht, in dem die Aminosäure Histidin fehlt und steigende Konzentrationen von 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) (0 mM, 50 mM und 100 mM) beinhaltet. Dafür wurde jede Kolonie in 500 μL ddH₂O resuspendiert und Verdünnungen bis 10^{-4} erstellt. Jeweils 10 μL der Verdünnungen 10^{-2} bis 10^{-4} wurden auf die unterschiedlichen Selektionsplatten getropft. In Abbildung 17 ist das Tropfschema dargestellt.

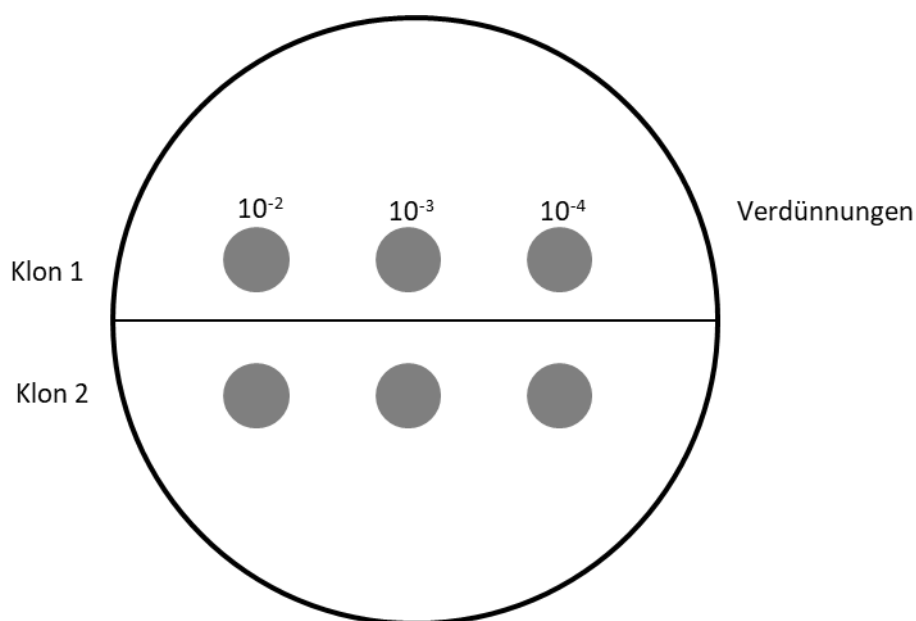


Abbildung 17: Tropfschema zur Bestimmung der Hintergrundaktivität des Bait-Stammes

Die Platten wurden für drei Tage bei 30 °C inkubiert. Anhand des Wachstums der Hefekolonien auf den verschiedenen Selektionsmedien kann die Konzentration von 3-AT zur Unterdrückung der Hintergrundaktivität des zu analysierenden Promotors bestimmt werden. Diese Konzentration von 3-AT wird in einem Yeast One-Hybrid Screen (3.15.39) verwendet.

3.15.39. Yeast One-Hybrid Screen mit einer Transkriptionsfaktor *only-library*

Zum Screenen von DNA-bindenden Proteinen, die an den zu analysierenden synthetischen Promotor binden, wurde eine Hefetransformation mit einer hohen Transformationseffizienz durchgeführt. Dazu wurde der zu analysierende Bait-Stamm auf SD-Medium ohne Tryptophan (- Trp) ausgestrichen und für 3 bis 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Von diesem Hefestamm wurden vier 5 mL SD – Trp Vorkulturen angeimpft und bei 30 °C und 180 rpm über Nacht kultiviert. Die Vorkulturen wurden vereinigt und mittels Thomakammer die Zellzahl bestimmt. $2,5 \cdot 10^8$ Zellen wurden durch eine Zentrifugation bei 3000 g für 5 min pelletiert und in 1 mL 2x YPDA resuspendiert. Diese Hefesuspension wurde in einen Kolben mit 50 mL 2x YPDA überführt und für 4 - 6 h bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Bei einer Zellzahl von $2 \cdot 10^7$ Zellen/mL wurden diese durch Zentrifugation pelletiert. In 1 mL ddH₂O wurden die Hefezellen resuspendiert und jeweils 100 µL der Suspension in zehn 1,5 mL Reaktionsgefäße aufgeteilt. Folgender 10x Transformationsansatz wurde erstellt:

| | |
|---------|---|
| 2400 µL | 50 % PEG 3350 |
| 360 µL | 1 M Lithiumacetat, pH 7,0 |
| 500 µL | 2 mg/mL Carrier-DNA (5 min bei 95 °C aufgeköcht, danach auf Eis) |
| 50 µL | 100 ng/µL Transkriptionsfaktor <i>only-library</i> (Mitsuda <i>et al.</i> , 2010) |
| 290 µL | ddH ₂ O |

Jeweils 360 µL des Transformationsansatzes wurden auf die Pellets gegeben und resuspendiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 40 min in einem Wasserbad wurden die Zellen pelletiert und in 1 mL 2x YPDA resuspendiert. In einem 100 mL Kolben wurden die verschiedenen Suspensionen vereinigt und für 90 min bei 30 °C und 180 rpm kultiviert. Nach einer Zentrifugation wurden die Zellen in 12,5 mL ddH₂O resuspendiert. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden zweimal jeweils 10 und 20 µL auf SD –Trp/Leu Medium ausplattiert. Zur Selektion auf eine Interaktion zwischen einem Transkriptionsfaktor und dem zu analysierenden Promotorkonstrukt wurden jeweils in 500 µL auf SD –Trp/Leu/His mit 3-AT ausplattiert. Die entsprechende Konzentration von 3-AT wurde nach 3.15.38 bestimmt. Die verschiedenen Platten wurden bei 30 °C für 3 bis 5 Tage kultiviert.

Nach der Inkubation wurde zur verstärkten Selektion auf eine positive Inkubation eine Replikaplattierung durchgeführt. Dazu wurden entsprechende Klone auf frisches Selektionsmedium überführt und erneut für 2 Tage bei 30 °C kultiviert. Zwei weitere Male wurden die Hefekolonien mittels Samstempel auf frisches Medium übertragen und kultiviert.

Hefeklone, die nach der Replikaplattierung auf dem Selektionsmedium gewachsen sind, wurden näher untersucht. Dazu wurden die Prey-Plasmide isoliert (3.15.26) und eine PCR (3.15.11) mit den Primern Gal4AD (6149) und Gal4AD-RV (6148) durchgeführt. Die verschiedenen PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die verschiedenen Größen der Fragmente verglichen. PCR-Produkte, die eine gleiche Fragmentlänge aufweisen, könnten von der gleichen cDNA stammen. Verschiedene Amplifikate wurden zur Sequenzierung ausgewählt. Die PCR-Fragmente wurden nach 3.15.13 aufgereinigt und nach 3.15.27 mit dem Primer Prey_attB_fwd (7087) zum Sequenzieren verschickt. Zur Identifizierung der isolierten Transkriptionsfaktoren wurde mit den Sequenzierungsergebnissen eine BLAST-Analyse (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) durchgeführt.

Wurde ein Transkriptionsfaktor mehrfach in einem Yeast One-Hybrid Screen gefunden, wurde eine Retransformation durchgeführt. Zu diesem Zweck wird eine höhere Konzentration des Prey-Plasmides benötigt. Dazu wurde das aus Hefezellen isolierte Prey-Plasmid in *E. coli* transformiert (3.15.23) und auf Selektionsmedium kultiviert. Aus einer 3 mL Kultur wurde eine Minipräparation (3.15.25) durchgeführt. Das Prey-Plasmid wurde in den entsprechenden Bait-Stamm transformiert (3.15.37), auf dem Medium SD –Trp/Leu ausplattiert und kultiviert. Jeweils zwei Kolonien wurden in ddH₂O bis zu einer Verdünnung von 10⁻⁴ verdünnt und jeweils 10 µl der Verdünnungen 10⁻² bis 10⁻⁴ auf den verschiedenen Selektionsplatten aufgetropft und kultiviert. Ist ein Wachstum über der 3-AT-Grenze des Bait-Stammes vorhanden (3.15.38) kann von einer Interaktion zwischen dem isolierten Transkriptionsfaktor und dem analysierten Promotorfragment ausgegangen werden.

3.15.40. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen kann eine diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) verwendet werden. Durch eine Anlagerung von Natriumlaurylsulfat (SDS) erhalten Proteine eine negative Ladung, weshalb eine Auftrennung abhängig der Proteingröße in einer Gelelektrophorese erfolgen kann. In PAGE-Gelen kann die Porengröße abhängig der Polyacrylamid-Konzentration variiert und entsprechend der zu trennenden Proteingrößen angepasst werden. In einem großporigen Sammelgel mit einem niedrigen pH-Wert erfolgt eine Konzentrierung der Proteine, wohingegen im Trenngel die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht erfolgt.

In der vorliegenden Arbeit wurden 12 % Trenngele nach folgendem Rezept verwendet.

Trenngel (12 %)

| | |
|---------|---|
| 1,65 mL | ddH ₂ O |
| 2 mL | Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) |
| 1,25 mL | 1,5 M TRIS, pH 8,8 |
| 50 µL | 10 % (w/v) SDS |
| 50 µL | 10 % (w/v) APS |
| 6 µL | TEMED |

Zur Variierung der Porengröße des Trenngels kann die Acrylamid-Konzentration durch Änderung des Rotiphorese® Gel 30 Volumes angepasst werden. Eine Polymerisation des Acrylamids erfolgt durch APS und TEMED, weshalb zügig nach Ansetzen des Gelgemisches gevortext und die Suspension zwischen zwei Glasplatten (7,3 cm x 10,1 cm) für Minigele mit 1 mm Spacer gegossen wurden. Für eine ebene Trennschicht wurde das Gel mit 1 mL Isopropanol überschichtet. Nach Aushärten des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und mit einem Sammelgel überschichtet. In das noch flüssige Sammelgel wurde ein Kamm für eine Beladungstasche der Proben in die Apparatur gesetzt.

Sammelgel (6 %)

| | |
|---------|---|
| 1,31 mL | ddH ₂ O |
| 400 µL | Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) |
| 250 µL | 1 M TRIS, pH 6,8 |
| 20 µL | 10 % (w/v) SDS |
| 20 µL | 10 % (w/v) APS |
| 6 µL | TEMED |

Nach Polymerisation wurde das PAGE-Gel in die Elektrophorese-Apparatur (MiniProtein Tetra System, Bio-Rad, München, Deutschland) eingespannt.

Die zu untersuchenden Proben wurden mit 5x SDS-Ladepuffer versetzt (Endkonzentration 1x) und bei 95 °C für 10 min aufgekocht. Die Proben wurden zusammen mit einem Größenstandard (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) auf das PAGE-Gel aufgetragen und bei 100 V in 1x Tris-Glycin-Puffer aufgetrennt. Nach gewünschter Auftrennung wurde das PAGE-Gel aus den Glasplatten entfernt und eine Coomassie-Färbung (3.15.41) oder ein Western Blot (3.15.42) durchgeführt.

3.15.41. Coomassie-Färbung von PAGE-Gelen

Zur Anfärbung von Proteinen wird der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue verwendet. Dieser bindet im sauren Milieu an die basischen Aminosäuren Histidin, Lysin und Arginin.

Das Trenngel nach einer SDS-PAGE (3.15.40) wurde kurz mit ddH₂O gespült und danach in eine Coomassie-Färbelösung (3.2.17) überführt und für 30 min unter leichtem Schwenken inkubiert. Zur Entfärbung wurde die Färbelösung entfernt und das Gel über Nacht unter Schwenken im Entfärber (3.2.17) inkubiert. Nach Entfärbung wurde das PAGE-Gel in ddH₂O überführt und fotografisch mit Hilfe der ChemiDoc Touch dokumentiert.

3.15.42. Western Blot

Die Methode des Western Blots wird für einen spezifischen Nachweis von bestimmten Proteinen verwendet. Dabei werden Proteine, die zuvor in einer SDS-PAGE (3.15.40) aufgetrennt wurden, auf eine Trägermembran immobilisiert und anschließend mit einem spezifischen Antikörper detektiert. In dieser Arbeit wurde eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran (Millipore Immobilon P, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

Nach Auftrennung des Proteinextraktes in einer SDS-PAGE (3.15.40) wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel für 15 min in Transferpuffer inkubiert. Parallel wurde die PVDF-Transfermembran vorbereitet. Diese wird für ca. 10 sec in Methanol aktiviert, für 2 min in ddH₂O gewaschen und 5 min in Transferpuffer equilibriert. Zum Transfer wurde das „Mini Trans-Blot Cell“-System von Bio-Rad (München, Deutschland) verwendet. In folgender Reihenfolge zur Anode der Blotting-Apparatur wurde der Transfer aufgebaut: Auf einem Schwamm wurde ein 3 M Whatman-Papier (Whatman International Ltd, Maidstone, England) gelegt, darauf das Trenngel, die Membran und wieder ein 3 M Whatman-Papier und Schwamm. Alle Komponenten sind im Transferpuffer durchtränkt worden. Die Kassette wurde verschlossen und in die Blotting-Apparatur eingespannt. Der Transfer erfolgte bei 30 V und 4 °C über Nacht.

Nach dem Transfer wurde die Membran für 30 min in Blocking-Puffer unter Schwenken inkubiert. 10 mL des primären Antikörpers (Tabelle 2 in 3.14) wurde hinzugefügt und für 1 h unter Schwenken inkubiert. Die Membran wurde dreimal für 15 min mit 1x PBST gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper (Tabelle 2 in 3.14) verdünnt und 10 mL der Antikörper-Lösung auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubation für 1 h unter Schwenken, wurde die Membran dreimal für 15 min in 1x PBST gewaschen.

Zur Entwicklung der Membran wurde das ChemiDoc™ Touch Imaging System verwendet. Dazu wurden je 200 µL der Entwicklerlösung 1 und 2 gemischt und auf die Membran gegeben. In der ChemiDoc Touch wurde die Chemilumineszenz der Antikörperreaktion detektiert und eine Aufnahme erstellt. Anhand des Markers auf der Membran wurde die Größe des Signals ermittelt.

Um geblottene Proteine mit einem anderen Antikörper nachzuweisen, kann eine Membran gestrippt werden. Dabei werden die gebundenen Antikörper entfernt, sodass andere Antikörper zur Detektion der untersuchten Proteine verwendet werden können. Zum Strippen wurde die Membran für 20 min in 20 mL Stripping-Lösung unter Schwenken inkubiert. Nach dreimaligen Waschen für 5 min mit 1x PBST wurde die Membran über Nacht unter Schwenken in Blocking-Puffer inkubiert. Die Inkubation der anderen Antikörper erfolgte wie oben beschrieben.

3.15.43. Überexpression und Aufreinigung rekombinanter Proteinen in *Escherichia coli*

Zur Überexpression von Proteinen wurde der Stamm BL21 des Darmbakteriums *E. coli* verwendet. Dieser Stamm zeichnet sich durch eine hohe Expressionsrate von rekombinanten Proteinen aus. Zur Expression wurde das pQE-Vektorsystem von Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Die entsprechenden Vektoren erlauben eine IPTG-induzierbare Expression des N-terminal His-getaggen Proteins.

Zur Expression und Aufreinigung von NF-κB p65 bzw. WRKY26 wurde eine 5 mL Vorkultur in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine 200 mL Hauptkultur mit 1/60 Volumen der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Mit Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM wurde die Expression des rekombinanten Proteins induziert. Nach 2 h Expressionszeit wurden die Zellen durch eine Zentrifugation bei 4000 g für 20 min und 4 °C geerntet. Das Zellpellet konnte bei -20 °C gelagert oder direkt weiterverwendet werden.

Zum Aufschluss der Bakterien wurden alle weiteren Schritte auf Eis mit gekühlten Lösungen durchgeführt. Das Pellet wurde in 4 mL NPI-10 pro Gramm Zellpellet resuspendiert und mit Benzoase® Nuclease (3 Units/ml Hauptkultur; Sigma-Aldrich, München, Deutschland), Lysozym (Endkonzentration 1 mg/mL) und „Halt Protease Inhibitor Cocktail, EDTA free“ (Endkonzentration 1x, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) versetzt und für 30 min inkubiert. Zum weiteren Aufschluss wurde eine sechsmalige Ultraschallbehandlung für 10 sec bei 200 W mit Kühlung auf Eis durchgeführt. Zur Reinigung der Proteinlösung von Zelltrümmern wurde für 30 min bei 10000 g und 4 °C zentrifugiert.

Zur Aufreinigung der His-getaggtten rekombinanten Proteine wurde die „Chelating Sepharose Fast Flow“ (GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet. Zur Beladung der Sepharose mit Nickel-Ionen wurde 1 mL der Sepharose-Suspension verwendet. Die Sepharose wurde in einem 50 mL Falcon durch Zentrifugation bei 500 g für 30 sec pelletiert und für 5 min in 5 mL ddH₂O in einem Überkopfschüttler gewaschen und erneut pelletiert. Die Sepharose wurde in 500 µL 0,1 M NiSO₄-Lösung resuspendiert und für 5 min in einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde die beladene Sepharose wieder pelletiert und dreimal in 5 mL ddH₂O gewaschen. Darauf wurde das Pellet in 1 mL NPI-10 resuspendiert und mit der Proteinlösung versetzt. Zur Bindung des rekombinanten Proteins an die Nickel-Sepharose wurde die Suspension für 1 h im Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation wurde die Sepharose mit gebundenen Protein dreimal mit einer steigenden Konzentration von Imidazol gewaschen (NPI-10, NPI-20 und NPI-30). Zur Elution des rekombinanten Proteins wurden zwei Inkubations- und Zentrifugationsschritte mit jeweils 1 mL NPI-500 durchgeführt. Zur Analyse der Aufreinigung des rekombinanten Proteins wurde eine SDS-PAGE (3.15.40) mit anschließender Coomassie-Färbung (3.15.41) und Western Blot (3.15.42) durchgeführt. Bei einer erfolgreichen Aufreinigung wurde die jeweilige Elutionsfraktion dialysiert (3.15.44).

3.15.44. Dialyse

Zur Lagerung und weiteren Verwendung in EMSA Experimenten (3.15.45) wurden die unter 3.15.43 aufgereinigten Proteine einer Dialyse unterzogen. Zur Dialyse wurden die Float-A-Lyzer G2 (Spectrum Laboratories, Brada, Niederlande) mit einer Ausschlussgrenze von 3,5 – 5 kDa verwendet. Die Dialyseschläuche wurden nach Herstellerangaben vorbereitet und anschließend mit 1 mL der Probe beladen. Die Dialyse erfolgte über Nacht unter Rühren bei 4°C gegen 2 L 1x Gelshift-Bindungspuffer. Bei der Dialyse von rekombinant exprimierten und aufgereinigten WRKY26 enthielt der Gelshift-Bindungspuffer 0,2 mM ZnSO₄. Am darauffolgenden Tag wurden die Konzentration der umgepufferten Proteine bestimmt (3.15.34), die Proteinsuspension in 100 µL Aliquots aufgeteilt, bei – 20 °C gelagert und in EMSA Experimenten (3.15.45) verwendet.

3.15.45. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Zur Analyse von Protein-DNA-Interaktionen eignet sich die Methode des Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) oder Gelshift-Assay. Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass ein Protein-DNA-Komplex bei einer elektrophoretischen Auftrennung eine geringere Laufgeschwindigkeit in einer Gelmatrix aufweist im Vergleich zu einem DNA-Fragment ohne Protein. Ein EMSA kann in eine Bindungsreaktion, Elektrophorese und Probendetektion aufgeteilt werden. In der Bindungsreaktion wird das zu

untersuchende Protein mit markierten Oligonukleotid inkubiert, sodass bei einer Interaktion ein Protein-DNA-Komplex entsteht. In der Elektrophorese werden die DNA-Protein-Komplexe und freien DNA-Moleküle in einer Gelmatrix aufgetrennt. Die Probendetektion ist der letzte Schritt in der die verwendeten DNA-Sonden in ungebundenen als auch in den Protein-DNA-Komplexen nachgewiesen und sichtbar gemacht wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Arten von EMSAs in der sich die DNA-Markierung unterscheiden durchgeführt. Bei EMSAs mit Biotin-markierten DNA-Sonden wurde das „LightShift Chemiluminescent EMSA Kit“ (Thermo Fisher Scientific, IL, USA) verwendet. Die Biotin-Markierung und das Annealing der zu untersuchenden Oligonukleotide sind unter 3.15.19 und 3.15.17 beschrieben. In EMSAs, die radioaktiv-markierte Sonden verwenden, wurde die forward DNA-Sonde von der Firma Hartmann Analytic (Braunschweig, Deutschland) mit radioaktiven P32 am 5'-Ende mit einer spezifischen Aktivität von 34 TBq/mmol markiert. Der markierte Strang wurde mit den entsprechenden Gegenstrang in der gleichen Konzentration annealed (3.15.17) und 1:10 verdünnt (0,05 µg/µL DNA).

Zur Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe wurde ein 6 % Acrylamidgel nachfolgendem Rezept angesetzt und zwischen die zu dem „Mini Protean Tetra Cell“ (Bio-Rad, München, Deutschland) gehörenden Glasplatten für Mini-Gele (7,3 x 10,1 cm, 1 mm Spacer) gegossen und ausgehärtet:

Tabelle 7: EMSA 6 % Acrylamidgel

| | |
|---------|---|
| 5,55 mL | ddH ₂ O |
| 1,25 mL | Rotiphorese® Gel 40 (29:1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) |
| 750 µL | 5x TBE |
| 75 µL | 10 % (w/v) APS |
| 9 µL | TEMED |

Vor dem Auftragen der Proben wurden die Taschen mit 0,5x TBE gespült und für 30 min bei 100 V in 0,5x TBE vorelektrophoretisiert.

Für Bindungsreaktionen wurden die in *E. coli* exprimierte und aufgereinigte rekombinanten Protein verwendet (3.15.43). Ein Reaktionsansatz mit NF-κB p65 ist in Tabelle 8 aufgeführt und ein Reaktionsansatz von WRKY26 in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 8: EMSA Bindungsansatz von NF-κB p65

| Komponenten | Volumen |
|----------------------------------|----------|
| ddH ₂ O | X µL |
| 10x Gelshift-Bindungspuffer | 2 µL |
| 1 µg/µL Poly(dI-dC) | 1 µL |
| 10 µM Unmarkierte Kompetitor-DNA | 1 -4 µL |
| Aufgereinigtes NF-κB p65 Protein | 4 - 5 µg |
| 0,01 µM Biotin-markierte DNA | 2 µL |
| Gesamt | 20 µL |

Tabelle 9: EMSA Bindungsansatz für WRKY26

| Komponenten | Volumen |
|-------------------------------------|----------|
| ddH ₂ O | X µL |
| 10x Gelshift-Bindungspuffer | 2 µL |
| 1 µg/µL Poly(dI-dC) | 1 µL |
| 5 µg Unmarkierte Kompetitor-DNA | 4 µL |
| Aufgereinigtes WRKY26 Protein | 4 - 5 µg |
| 0,05 µg µM radioaktiv-markierte DNA | 1 µL |
| Gesamt | 20 µL |

Reaktionsansätze mit Kompetitor-Oligonukleotiden wurden vor Zugabe der markierten DNA für 10 min bei RT vorinkubiert. Nach Zugabe der markierten Oligonukleotide wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und für 25 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 5 µL des 5x EMSA-Ladepuffers wurde die Probe bei 100 V in dem 6 % Polyacrylamidgel aufgetrennt. Sobald die Bromphenolblau-Bande das untere Viertel des Gels erreicht hat, wurde die Elektrophorese beendet. Bei Biotin-markierten Sonden wurde mit Hilfe des „Mini Trans-Blot Cell“ (Bio-Rad, München, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben des LightShift Chemiluminescent EMSA Kit für 30 min bei 380 mA die Oligonukleotide auf eine Biotinylated Nylon-Membran (Thermo Fisher Scientific, IL, USA) geblottet. Die DNA wurde anschließend durch die Auto-Crosslink Funktion des „Stratalinker UV-Crosslinker“ (Stratagene, La Jolla, CA, USA) auf der Membran fixiert. Die fixierte Membran kann für mehrere Tage gelagert oder direkt weiterverwendet werden. Die Detektion der Biotin-markierten Sonden erfolgte entsprechend der Angaben des LightShift Chemiluminescent EMSA Kits mit Hilfe des ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad, München, Deutschland). Bei radioaktiv-markierten Sonden wurde das EMSA-Gel mit dem Gel Dryer (Bio-Rad, München, Deutschland) nach Herstellerangaben getrocknet. Auf das

getrocknete Gel wurde ein Röntgenfilm gelegt und dieser über Nacht bei – 80 °C exponiert. Anschließend wurde der Röntgenfilm entwickelt, in dem dieser für 90 sec in Entwicklerlösung, 15 sec in Wasser, 60 sec in Fixierungslösung und 15 sec in Wasser geschwenkt wurde.

4. Ergebnisse

4.1. Vorhersage und Analyse der Interaktion des murinen NF- κ B p65 mit WT-Box beinhaltenden *cis*-Sequenzen

4.1.1. Vorhersage einer potentiellen Interaktion des murinen NF- κ B p65 mit WT-Boxen

Zur Identifizierung von WT-Box-bindenden Proteinen aus verschiedenen Organismen, wurden die WT-Boxen aus Sequenz 15, 18 und 24 mit der footprintDB Datenbank analysiert. Die Datenbank enthält Transkriptionsfaktorbindestellen und Daten von DNA-Protein Interfaces aus Kristallstrukturen von verschiedenen Organismen (Contreras-Moreira, 2010; Sebastian und Contreras-Moreira, 2014).

Die drei Typ II WT-Boxen GGACTTTC, GGACTTTT und GGACTTTG, sowie die WT-Box AGACTTTT aus Sequenz 18 wurden an footprintDB (<http://floresta.eead.csic.es/footprintdb/>) online übermittelt und eine *sequence search* durchgeführt. Die Analyse wurde mit Daten aus allen Organismen durchgeführt. Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse der Analyse. Für GGACTTTC wird mit dem niedrigsten e-value der murine NF- κ B p65 Transkriptionsfaktor ermittelt. Kein anderer Transkriptionsfaktor zeigt einen niedrigeren e-value. Die anderen analysierten Typ II WT-Boxen, GGACTTTT und GGACTTTG, zeigen für den murinen NF- κ B p65 höhere e-values, aber sieben von acht Nukleotiden stimmen mit der NF- κ B p65 Bindungsstelle überein (Tabelle 10). Für die WT-Box AGACTTTT wird eine Interaktion mit NF- κ B p65 mit einem e-value von $1,3 \times 10^{-5}$ vorhergesagt. Sechs von acht Nukleotiden dieser WT-Box stimmen mit der NF- κ B p65 Bindungsstelle überein. Von den vier verschiedenen potentiellen Interaktionen mit NF- κ B p65 zeigt die WT-Box AGACTTTT den höchsten e-value (Tabelle 10).

Da NF- κ B Transkriptionsfaktoren in der angeborenen Immunität von Tieren beteiligt sind und die WT-Boxen verantwortlich für MAMP-responsive Reportergenaktivität in pflanzlichen Zellen sind (Machens *et al.*, 2014; Lehmeier *et al.*, 2016; Kanofsky *et al.*, 2017), wurde die bioinformatisch vorhergesagte Interaktion experimentell untersucht.

Tabelle 10: FootprintDB vorhergesagte Interaktion des murinen NF-κB p65 mit den WT-Boxen

| Suchanfrage: Sequenz | footprintDB Template | Quelle | Organismus | STAMP e-value | Motiv Ähnlichkeit | Sequenz / footprintDB PWM Konsensus |
|-------------------------|-------------------------|------------------------------|-----------------|------------------|----------------------|--|
| GGACTTTC | 1le9_AB: NF-κB p65 | 3D- footprint 20161221 | Mus musculus | 6.6e-13 | 8.00 / 8 | GGACTTTC-- GGACTtTCct |
| GGACTTTT | 1le9_AB: NF-κB p65 | 3D- footprint 20161221 | Mus musculus | 7.9e-09 | 7.00 / 8 | GGACTTTT-- GGACTtTCct |
| GGACTTTG | 1le9_AB: NF-κB p65 | 3D- footprint 20161221 | Mus musculus | 7.9e-09 | 7.00 / 8 | GGACTTTG-- GGACTtTCct |
| AGACTTTT | 1le9_AB: NF-κB p65 | 3D- footprint 20161221 | Mus musculus | 1,3e-05 | 5,99 / 8 | AGACTTTT-- GGACTtTCct |

4.1.2. NF-κB p65 aktiviert Reporterogenaktivität in Pflanzenzellen

Der Transkriptionsfaktor NF-κB p65 spielt eine zentrale Rolle in der Genregulation der angeborenen Immunität in Säugetieren. Zur Analyse, ob der murine NF-κB p65 in pflanzlichen Zellen Reporterogenaktivität vermitteln kann, wurde die cDNA des Transkriptionsfaktors in einen Expressionsvektor für Pflanzen (pORE) kloniert. Da es sein könnte, dass das murine Zellkernlokalisierungssignal und die Transaktivierungsdomäne in pflanzlichen Zellen nicht funktionell sind, wurden zusätzlich verschiedene rekombinante Fusionsproteine erstellt. Das Zellkernlokalisierungssignal des SV40 Virus (SV40) und die Aktivierungsdomäne des Hefetranskriptionsfaktors GAL4 (GAL4AD) wurden jeweils einmal einzeln und in Kombination N-terminal an NF-κB kloniert. Die entsprechenden Konstrukte werden als p65-pORE, SV40-p65-pORE, GAL4AD-p65-pORE und SV40-GAL4AD-p65-pORE bezeichnet. Die verschiedenen NF-κB p65 Konstrukte wurden als Effektorplasmide zusammen mit den synthetischen Reportergenplasmiden, welche das Tetramer von Sequenz 24 enthalten, in Petersilienprotoplasten transformiert.

Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse der gemessenen Reporterogenaktivitäten der Kotransformationen aus Petersilienprotoplasten. Die verschiedenen NF-κB p65 Konstrukte aktivieren eine Sequenz 24 vermittelte Reporterogenaktivität im Vergleich zum leeren pORE Vektor. Der murine NF-κB p65 zeigt eine gesteigerte durch Sequenz 24 vermittelte GUS-Aktivität. Dies deutet darauf, dass das murine Protein funktionell in Petersilienprotoplasten ist. Ein zusätzliches Zellkernlokalisierungssignal (SV40)

führt zu einer höheren GUS-Aktivität im Vergleich zum natürlichen NF- κ B p65 Transkriptionsfaktor (Vergleiche p65-pORE mit SV40-p65-pORE). Die zusätzliche Aktivierungsdomäne GAL4AD vermittelt eine verdoppelte Reporterogenaktivität im Verhältnis zu NF- κ B p65 (Vergleiche p65-pORE mit GAL4AD-p65-pORE). Ein Fusionsprotein aus NF- κ B p65 mit beiden zusätzlichen Domänen weist eine GUS-Aktivität wie das Konstrukt aus der Aktivierungsdomäne mit NF- κ B p65 auf (Vergleiche GAL4AD-p65-pORE mit SV40-GAL4AD-p65-pORE).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der murine NF- κ B p65 Transkriptionsfaktor funktionell in Petersilienzellen ist. Zusätzliche Zellkernlokalisierungssignale und Aktivierungsdomänen verstärken eine Reporterexpression. Da der native NF- κ B p65 ohne zusätzliche Domänen die Reporterexpression in pflanzlichen Zellen vermittelt, wurde in den folgenden Experimenten jeweils der native Transkriptionsfaktor verwendet.

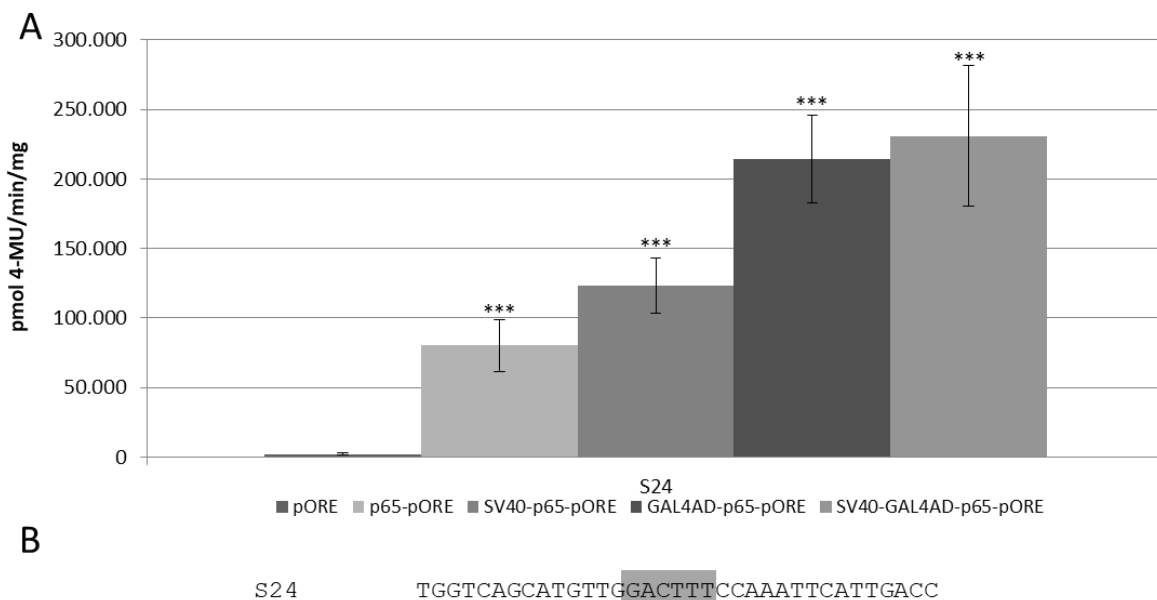


Abbildung 18: Die verschiedenen NF- κ B p65 Konstrukte aktivieren die Reporterogenaktivität in Petersilienprotoplasten

A: Transienter Reporter-Gen-Assay in Petersilienprotoplasten nach Kotransformation des Reporter-Gen-Plasmids mit dem Tetramer der Sequenz 24 (S24) und den verschiedenen NF- κ B p65 Konstrukten exprimierendem oder nicht exprimierendem Plasmid (pORE). p65-pORE: cDNA des murinen NF- κ B p65; SV40-p65-pORE: Zellkernlokalisierungssignal des SV40 Virus N-terminal an NF- κ B p65 kloniert; GAL4AD-p65-pORE: Aktivierungsdomäne des Hefetranskriptionsfaktors GAL4 N-terminal an NF- κ B p65 fusioniert. SV40-GAL4AD-p65-pORE: Fusionsprotein aus dem Zellkernlokalisierungssignal des SV40 Virus, der Aktivierungsdomäne von GAL4 und dem murinen NF- κ B p65. Mit * ist der statistische Unterschied der Reporter-Gen-Aktivität zwischen den Kotransformationen der verschiedenen NF- κ B Konstrukten im Bezug zum leeren pORE Vektor dargestellt (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). B: Nukleotidabfolge von Sequenz 24. Unterstrichen sind die W-Boxen (GGTCA und TTGACC), die WT-Box (GACTTT) ist grau hinterlegt. Die entsprechenden Werte zur Abbildung sind im Anhang in der Tabelle 12 aufgeführt.

4.1.3. Differentielle Regulation der NF- κ B p65 vermittelten Reporterogenaktivität durch WT-Box enthaltende *cis*-Sequenzen der Motivgruppe 27

Zur Ermittlung einer möglichen NF- κ B p65 Aktivierung von Reporterogenaktivitäten vermittelt durch WT-Box beinhaltende *cis*-Sequenzen, wurden die verschiedenen *cis*-Elemente aus Motivgruppe 27 zusammen mit dem NF- κ B p65 exprimierenden Vektor als Effektor im Petersilienprotoplastensystem kotransformiert.

In Abbildung 19 sind die gemessenen Reporterogenaktivitäten (A) und entsprechende Induktionsfaktoren (B) der Kotransformationen dargestellt. NF- κ B p65 aktiviert die Sequenz 15, 18 und 24 vermittelte Reportergenexpression. Die Sequenzen 20, 21, 22 und 23 zeigen eine Veränderung der GUS-Aktivitäten, die dem leeren pBT10 Vektor entspricht (Abbildung 19A). Für einen besseren Vergleich der Induktionsstärke wurden die Induktionsfaktoren berechnet und grafisch dargestellt (Abbildung 19B). Zur Berechnung der Induktionsfaktoren wurden die GUS-Aktivitäten der p65-pORE durch die pORE Kotransformation der entsprechenden *cis*-Sequenzen dividiert. Die Sequenzen 15, 18 und 24 zeigen in der Induktion eine signifikante Steigerung der Reporterogenaktivität im Vergleich zum leeren pBT10 Vektor. Die Induktion der Sequenzen 20, 21, 22 und 23 sind niedriger als die Induktion des leeren pBT10 Vektors (Abbildung 19B).

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B p65 mit einer unterschiedlichen Spezifität die *cis*-Sequenzen der Motivgruppe 27 reguliert. Die experimentell ermittelten Ergebnisse für Sequenz 15, 18 und 24 entsprechen den bioinformatischen Analysen mit der footprintDB Datenbank (4.1.1). Überraschend ist, dass die NF- κ B p65 aktivierte Reporterogenaktivität am stärksten bei Sequenz 18 ausfällt (Abbildung 19A), obwohl in der bioinformatischen Analyse mit dieser Sequenz der niedrigste e-value ermittelt wurde (Tabelle 10). Aufgrund der hohen NF- κ B p65 vermittelten Reporterogenaktivität wurden die *cis*-Sequenzen 15, 18 und 24 zusammen mit NF- κ B p65 in pflanzlichen Zellen näher untersucht. Dabei soll die Frage beantwortet werden, ob die WT-Box für die NF- κ B p65 vermittelte Reporterogenaktivität verantwortlich ist.

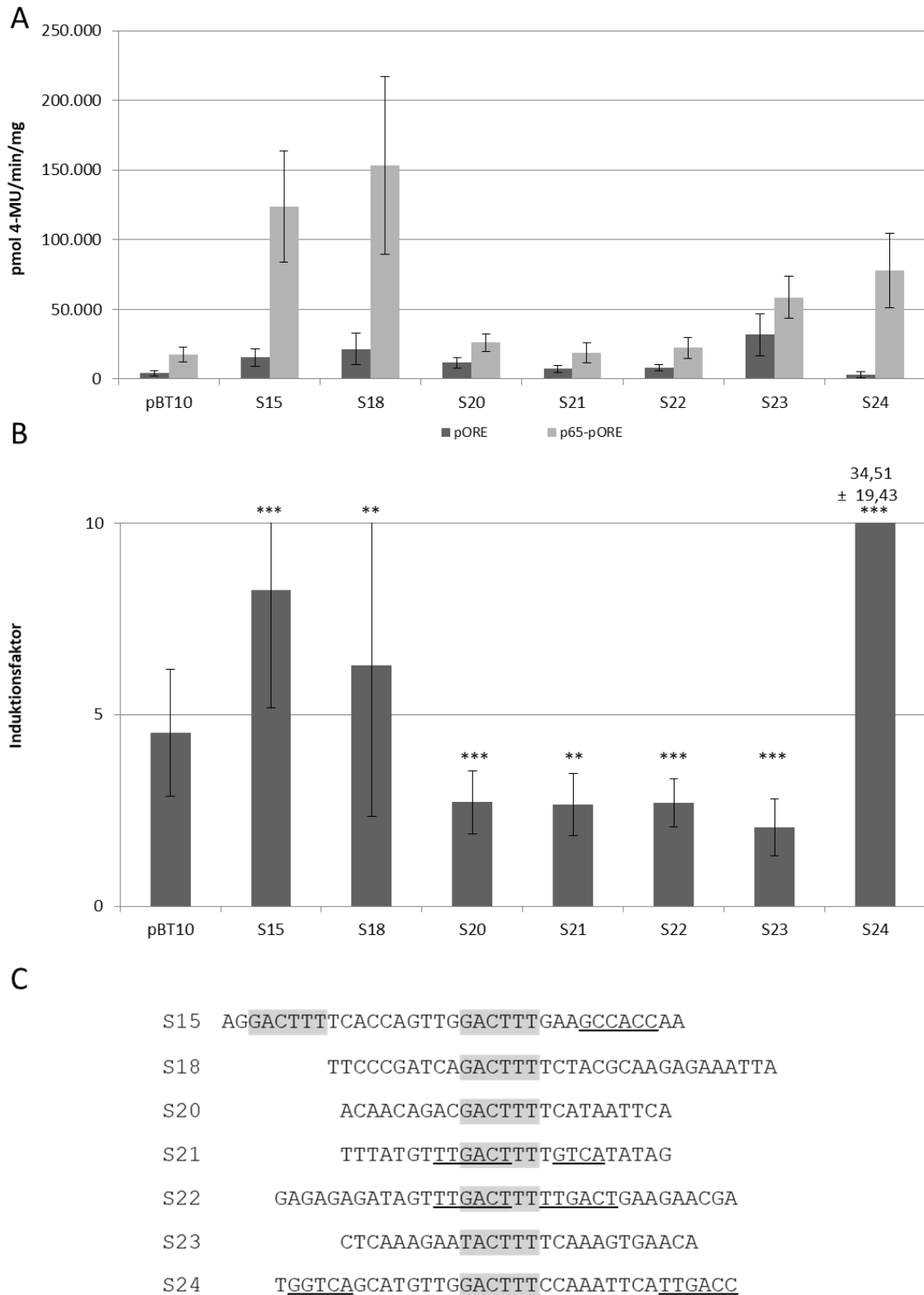


Abbildung 19: NF-κB p65 reguliert die Reporterogenaktivitäten der *cis*-Sequenzen aus Motivgruppe 27 unterschiedlich

A: Transienter Reporter-Gen-Assay in Petersilienprotoplasten nach Kotreansformation des NF-κB p65 exprimierenden oder leeren pORE Vektors als Effektor zusammen mit den verschiedenen Reporter-Gen-Plasmiden, die Tetramere der *cis*-Elemente aus Motivgruppe 27 beinhalten. B: Vergleich der Induktionsstärke der unterschiedlichen *cis*-Sequenzen aus Motivgruppe 27 vermittelt durch NF-κB p65. Die Berechnung der statistischen Unterschiede ist jeweils auf die Induktion des leeren pBT10 Vektors bezogen (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). C: Alignment der Sequenzen aus Motivgruppe 27. Die WT-Boxen sind grau hinterlegt, die W-Boxen sowie die GCC-Box aus S15 sind unterstrichen. Die entsprechenden Werte der GUS-Aktivitäten und der Induktion sind im Anhang in der Tabelle 13 und Tabelle 14 aufgeführt.

4.1.4. Die WT-Boxen in *cis*-Sequenz 15 sind verantwortlich für die NF- κ B p65 regulierte Reporterexpression

Lehmeyer *et al.* (2016) konnten zeigen, dass die WT-Boxen aus Sequenz 15 für eine MAMP-responsive Reporteraktivität notwendig sind. Zur Überprüfung, ob die NF- κ B p65 vermittelte Reporterexpression der Sequenz 15 abhängig von den WT-Boxen ist, wurden verschiedene Mutationen der Sequenz 15 in Kotransformationsexperimenten im Petersilienprotoplastensystem analysiert. Die Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der Kotransformation in Petersilienprotoplasten. In Abbildung 20A sind die ermittelten Reporteraktivitäten und in Abbildung 20B die entsprechenden Induktionsfaktoren dargestellt.

In Abbildung 20A ist erkennbar, dass NF- κ B p65 (p65-pORE) die Sequenz 15 vermittelte Reporteraktivität im Vergleich zur Kotransformation mit dem leeren pORE Vektor aktiviert. Zur Bestimmung des Einflusses der WT-Boxen in Sequenz 15 wurden verschiedene Reporterplasmide mit Mutationen in Sequenz 15 im Petersilienprotoplastensystem getestet. Eine Mutation in beiden WT-Boxen (S15mut12) zeigt eine GUS-Aktivität vergleichbar mit der Kotransformation des pORE Vektors. Kein Einfluss auf die NF- κ B p65 Aktivierung kann bei einer Mutation zwischen beiden WT-Boxen festgestellt werden (S15mut5). Mit einzelnen Mutationen in den WT-Boxen wurde analysiert, ob die WT-Boxen aus Sequenz 15 auf unterschiedliche Weise die NF- κ B vermittelte Reporterexpression regulieren. Im Unterschied zur Mutation in der ersten WT-Box (S15mut4), die einen Einfluss ähnlich der Doppelmutante (S15mut12) hat, hat eine Mutation in der zweiten WT-Box (S15mutd) einen geringeren Effekt auf die Reporteraktivität.

Diese Ergebnisse werden durch die Darstellung der Induktionsfaktoren unterstrichen (Abbildung 20B). Die Induktionsfaktoren der Sequenzen, in denen beide WT-Boxen (S15mut12) oder jeweils eine (S15mut4 und S15mutd) WT-Box mutiert sind, sind niedriger im Vergleich zur Wildtypsequenz (S15) und der Mutation zwischen beiden WT-Boxen (S15mut5).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die WT-Boxen GGACTTTT und GGACTTTG in Sequenz 15 für die NF- κ B vermittelte Reporterexpression in pflanzlichen Zellen verantwortlich sind.

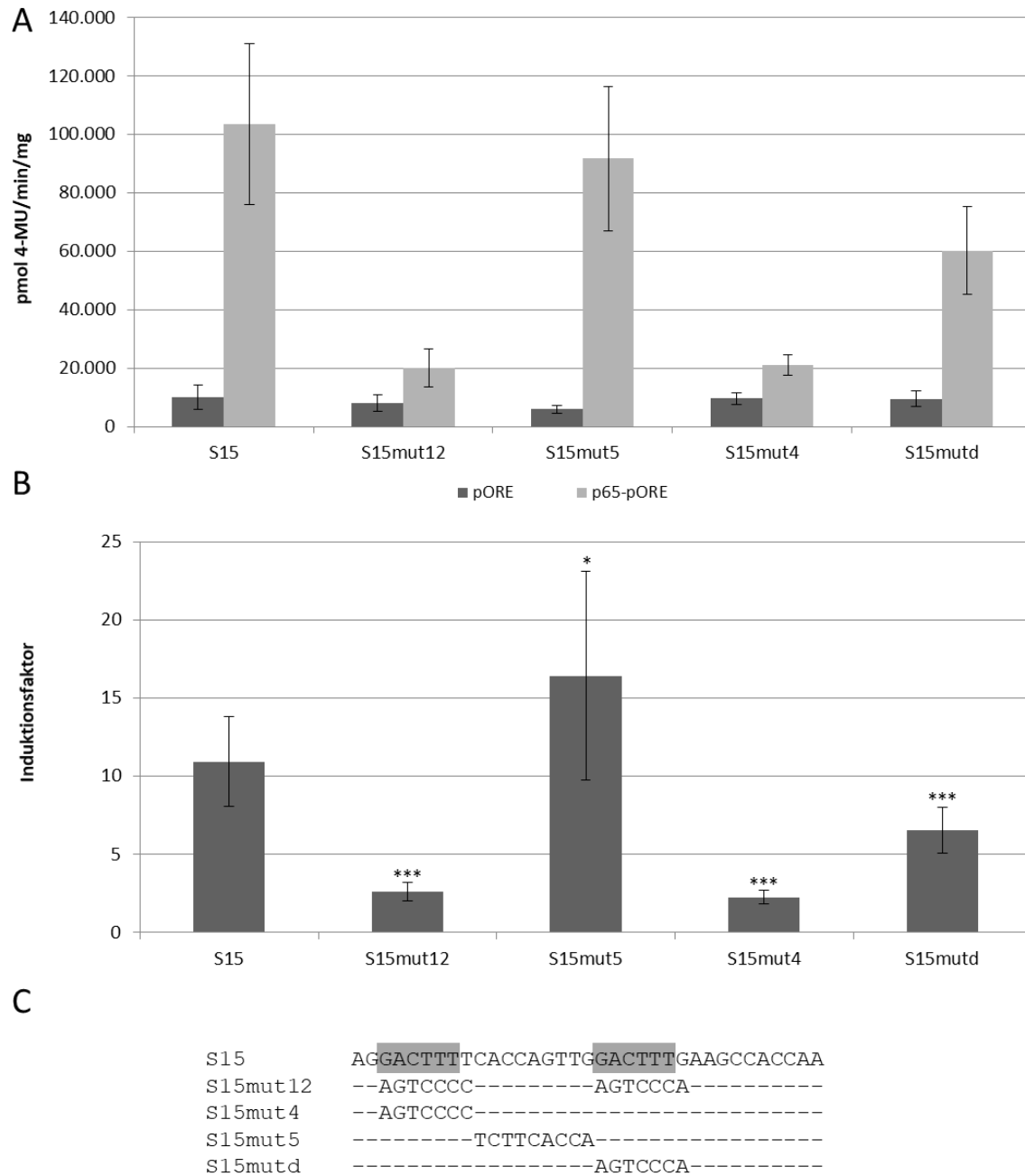


Abbildung 20: Die WT-Boxen in Sequenz 15 sind für die NF- κ B p65 aktivierte Reporterexpression in Petersilienprotoplasten verantwortlich

A: Transienter Reporter-Gen-Assay im Petersilienprotoplastensystem nach Kotreformation des NF- κ B p65 exprimierenden pORE Vektors als Effektor zusammen mit dem Reporter-Gen-Plasmid pBT10GUS-d35SLUC (pBT10), welches ein Tetramer der *cis*-Sequenz 15 oder entsprechende Mutationen trägt. B: Vergleich der Induktionsstärke der unterschiedlichen Mutationen der *cis*-Sequenz 15 vermittelt durch NF- κ B p65. Die Berechnung der statistischen Unterschiede ist jeweils auf die Induktion von Sequenz 15 bezogen (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). C: Die Sequenzen von S15 und die verschiedenen Mutationen sind gezeigt. Unveränderte Nukleotide werden als – dargestellt, veränderte werden gezeigt. Die WT-Boxen sind grau hinterlegt. Die Ergebnisse der GUS-Aktivitäten und Induktionsfaktoren sind im Anhang in Tabelle 15 und Tabelle 16 aufgelistet.

4.1.5. MAMP- und NF- κ B p65-responsive Reportergenaktivitäten benötigen die WT-Box aus der *cis*-Sequenz 18

Im Gegensatz zur Sequenz 15 wurde der MAMP-responsive Bereich von Sequenz 18 noch nicht analysiert. Zur Analyse des Einflusses der WT-Box aus *cis*-Sequenz 18 auf die MAMP- und NF- κ B p65-responsive Reportergenaktivität wurden Sequenz 18 und verschiedene Mutationen der Sequenz im Petersilienprotoplastensystem untersucht.

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse der Pep25-vermittelten Reportergenaktivitäten dargestellt. Wie bei Koschmann *et al.* (2012) kann gezeigt werden, dass Sequenz 18 eine geringe Pep25-Responsivität mit einer hohen Standardabweichung aufweist. Diese Reportergenaktivität ist durch eine Mutation innerhalb der WT-Box (S18mut1) nicht mehr nachweisbar. Eine Mutation in Sequenz 18 vor der WT-Box (S18mut2) hat ebenfalls diesen Effekt (Abbildung 21A). Damit begrenzt sich der Elicitor-responsive Bereich von Sequenz 18 nicht alleine auf die WT-Box. Aufgrund dessen wurden weitere Mutationen über die Sequenz 18 verteilt untersucht (Abbildung 21B). Die Mutationen 4 und 7 (S18mut4 und 7) zeigen eine sehr reduzierte Pep25-Responsivität, wohingegen die Mutationen 5 und 6 (S18mut5 und 6) keine Pep25-Responsivität mehr aufweisen. Innerhalb dieser Bereiche liegt die WT-Box. Überraschenderweise zeigt Mutation 8 (S18mut8) eine verstärkte Pep25-Responsivität. Aufgrund der Veränderung der Sequenz in S18mut8 könnte ein neues Pep25-responsives Element generiert oder ein Silencer-Element zerstört worden sein, deshalb wurden zwei weitere Mutationen in diesem Bereich erstellt und ebenfalls auf Pep25-Responsivität getestet. Beide mutierten *cis*-Sequenzen (S18mut10 und 11) zeigen eine Elicitor-Responsivität, die im Vergleich zur S18mut8 schwächer ausfällt. Weitere Analysen zur MAMP-Responsivität von Doppelmутanten der Sequenz 18, die jeweils die Mutation von S18mut8 tragen, konnten zeigen, dass die WT-Box für eine Pep25-vermittelte Reportergenaktivität benötigt wird (Abbildung 36 und Abbildung 37 im Anhang).

Durch die Analysen der MAMP-Responsivität von Sequenz 18 konnte gezeigt werden, dass die WT-Box im Pep25-responsiven Bereich des *cis*-Elements liegt.

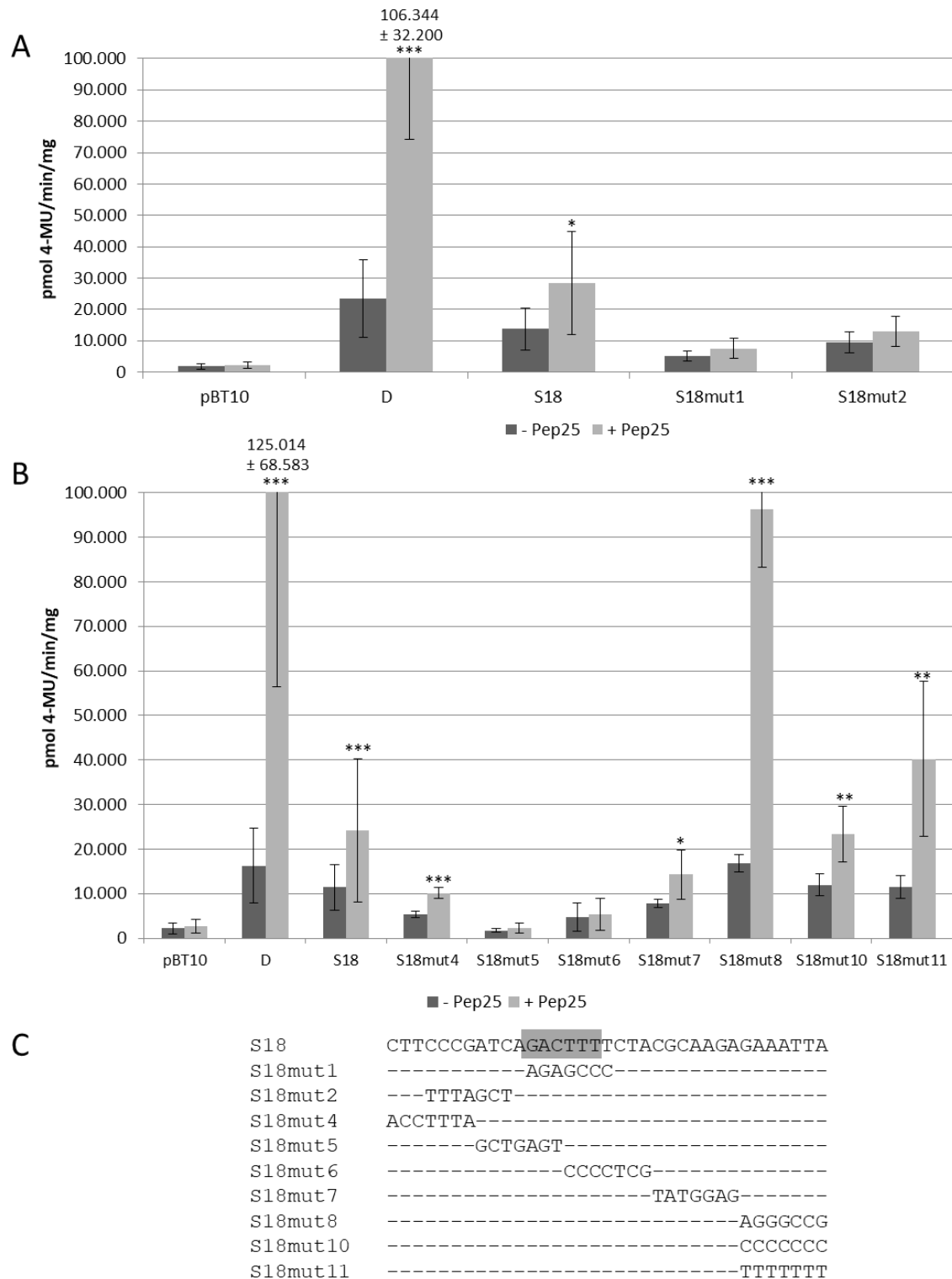


Abbildung 21: Pep25-Responsivität verschiedener Mutationen der Sequenz 18 in Petersilienprotoplasten

Transienter Reportergen-Assay im Petersilienprotoplastensystem. Nach der Transformation der Protoplasten wurden diese mit oder ohne dem Elicitor Pep25 behandelt. Der leere Vektor pBT10GUS-d35SLUC (pBT10) und der Vektor mit vier Kopien des Pep25-responsiven D-Elements (D) dienen als negativ und positiv Kontrolle. A: Transienter Reportergen-Assay der Mutationen 1 und 2 von Sequenz 18 im Vergleich zur Wildtypsequenz. B: Reportergenaktivitäten von sieben verschiedenen Mutationen der Sequenz 18 im Vergleich zur Wildtypsequenz. Die Berechnung der statistischen Unterschiede ist jeweils auf Pep25-behandelte bzw. unbehandelte Proben bezogen (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). C: Sequenz 18 und die verschiedenen Mutationen. Veränderte Nukleotide der Mutationen werden gezeigt; unveränderte werden nicht gezeigt (-). Die WT-Box ist grau hinterlegt. Die entsprechenden Werte zur Abbildung sind im Anhang in Tabelle 17 und Tabelle 18 aufgeführt.

Wie in Abbildung 19 gezeigt, führt die Anwesenheit von NF- κ B p65 zur Aktivierung einer Reporterexpression vermittelt durch Sequenz 18. Die WT-Box in Sequenz 18 zeigt eine Ähnlichkeit zur NF- κ B p65 Bindestelle (Tabelle 10). Zur Bestimmung des Einflusses der WT-Box auf diese Reporteraktivität wurden verschiedene Mutationen in Sequenz 18 in Kotransformationen getestet.

Abbildung 22 zeigt den Einfluss verschiedener Mutationen von Sequenz 18 auf die NF- κ B regulierten Reporteraktivitäten (Bachelorarbeit Marcel Staar, 2017). Die Reporteraktivitäten sind in Abbildung 22A und C, die Induktionsstärken der entsprechenden Proben sind in Abbildung 22B und D dargestellt.

Eine Mutation in der WT-Box und direkt davor (S18mut1 und S18mut2) verringern die NF- κ B p65 vermittelte GUS-Aktivität im Vergleich zur unmutierten Sequenz 18 (Abbildung 22A). Die Induktionsfaktoren von S18mut1 und 2 zeigen einen signifikant niedrigeren Unterschied zum Induktionsfaktor von Sequenz 18 (Abbildung 22B).

Da S18mut1 und 2 noch eine NF- κ B vermittelte Reporteraktivität aufweisen (Abbildung 22A), ist die WT-Box in Sequenz 18 vermeintlich nicht alleine für die NF- κ B Aktivierung verantwortlich. Aufgrund dessen wurden weitere Mutationen von Sequenz 18 in den Kotransformationsexperimenten getestet. Mutationen in den Bereichen S18mut4, 6 und 8 zeigen starke Abnahmen in der Reporteraktivität in Anwesenheit von NF- κ B p65 mehr auf (Abbildung 22C). Sequenz S18mut5 hat eine geringe NF- κ B p65 vermittelte GUS-Aktivität im Vergleich zur unmutierten Sequenz 18. Sequenz 18mut9 und 7 vermitteln eine NF- κ B Aktivierung der Reporterexpression auf dem Level der Wildtyp Sequenz 18 (Abbildung 22C).

Diese Ergebnisse werden durch Vergleiche der Induktionsstärke bekräftigt (Abbildung 22D). Die Induktionsfaktoren der Mutationen S18mut4, 5 und 8 ist signifikant niedriger als die Induktion der unmutierten Sequenz 18. Hingegen zeigen die Induktionsfaktoren von S18mut9, 5 und 7 eine Induktionsstärke vergleichbar oder höher als die Induktionsstärke der Wildtyp Sequenz 18.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass innerhalb von Sequenz 18 drei NF- κ B p65 responsive Bereiche liegen. In Abbildung 22E sind die NF- κ B p65 responsiven Bereiche unterstrichen. Die WT-Box AGACTTTT ist neben anderen Sequenzen für die Aktivierung der Reporteraktivität in Anwesenheit des murinen Transkriptionsfaktors NF- κ B p65 in pflanzlichen Zellen notwendig.

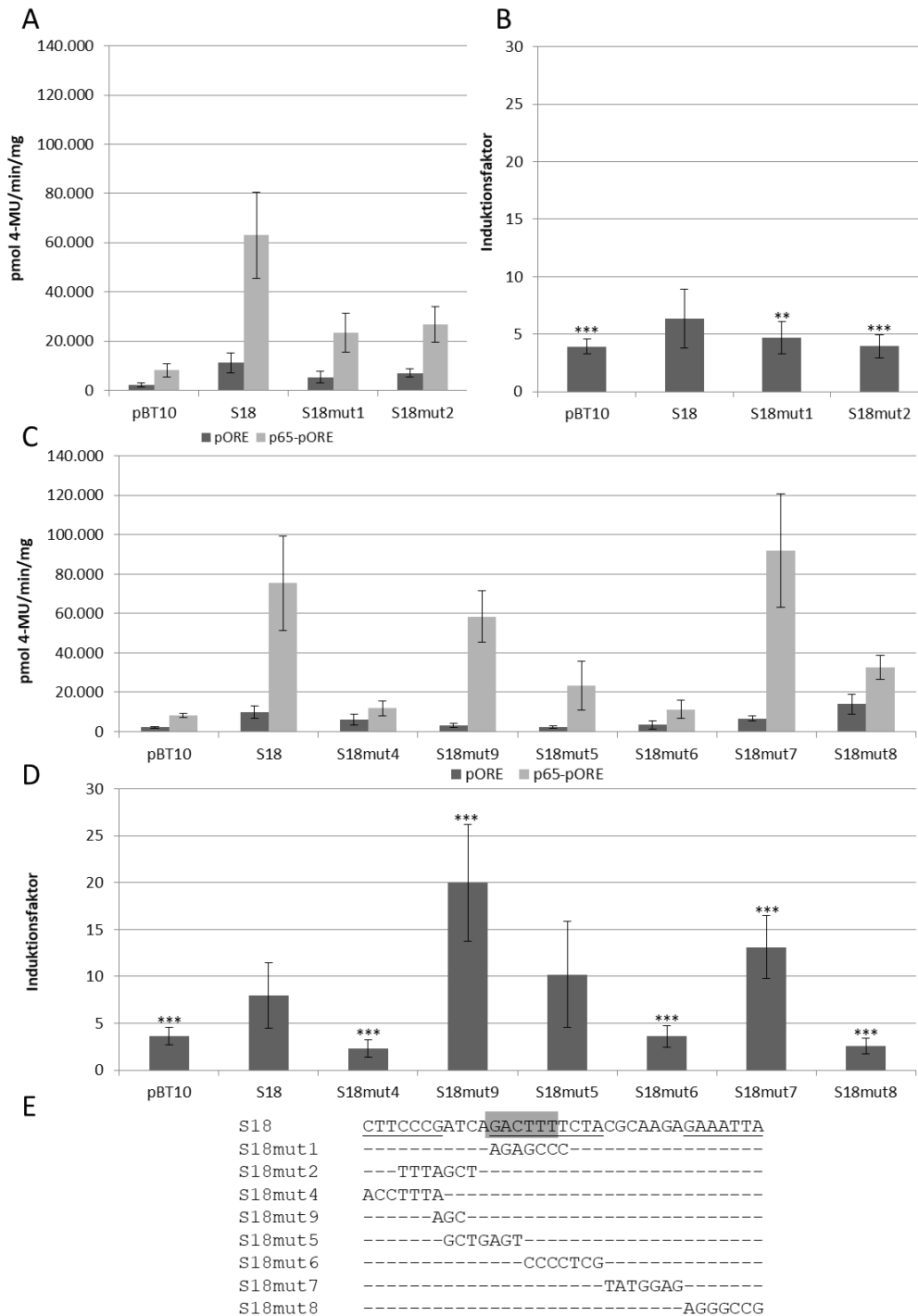


Abbildung 22: Die WT-Box und zwei weitere Bereiche in Sequenz 18 sind verantwortlich für die NF-κB p65 vermittelte Reporterexpression

A und C: Transienter Reporter-Gen-Assay in Petersilienprotoplasten nach Kotretransformation des NF-κB p65 exprimierenden pORE Vektors als Effektor zusammen mit dem Reporter-Gen-Plasmid pBT10GUS-d35SLUC (pBT10), welches ein Tetramer der *cis*-Sequenz 18 oder entsprechende Mutationen trägt. B und D: Vergleich der Induktionsstärke der unterschiedlichen Mutationen der *cis*-Sequenz 18 vermittelt durch NF-κB p65. Die Berechnung der statistischen Unterschiede ist jeweils auf die Induktion von Sequenz 18 bezogen (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). E: Die Sequenzen von S18 und die verschiedenen Mutationen sind gezeigt. Veränderte Nukleotide werden gezeigt, hingegen werden unveränderte Nukleotide als – dargestellt. Die WT-Box ist grau hinterlegt. Die NF-κB p65 responsiven Bereiche sind unterstrichen. Die Ergebnisse der GUS-Aktivitäten und Induktionsfaktoren sind im Anhang in Tabelle 21, Tabelle 22, Tabelle 23 und Tabelle 24 aufgeführt.

4.1.6. Die WT-Box in *cis*-Sequenz 24 ist verantwortlich für die NF-κB p65 regulierte Reporterexpression

Kanofsky *et al.* (2017) konnten zeigen, dass die WT-Box Teil des MAMP-responsiven Bereiches der *cis*-Sequenz 24 ist. Zur Überprüfung, ob die NF-κB p65 vermittelte Reporterexpression der Sequenz 24 abhängig von der WT-Box ist, wurden verschiedene Kotransformationen mit Mutationen der Sequenz 24 im Petersilienprotoplastensystem durchgeführt.

In Abbildung 23 sind die Ergebnisse zur Bestimmung des NF-κB p65 responsiven Bereiches dargestellt. In Abbildung 23A sind die Reportergenaktivitäten und in Abbildung 23B Induktionsfaktoren der entsprechenden Proben gezeigt.

Eine Mutation innerhalb der WT-Box (S24mut5) zeigt keine Reporterexpression in Anwesenheit von NF-κB p65 im Vergleich zur Wildtyp Sequenz 24 (Abbildung 23A). Hingegen haben Mutationen upstream (S24mut8) und downstream (S24mut4) der WT-Box keinen Effekt auf die GUS-Aktivität. Nur eine Mutation direkt downstream der WT-Box (S24mut9) zeigt eine geringere Reportergenaktivität im Vergleich zur unmutierten Sequenz 24.

Diese Ergebnisse werden durch die Darstellung der Induktionsfaktoren bestätigt (Abbildung 23B). Die Induktionsfaktoren von S24mut8 und 4 zeigen keinen Unterschied zur Wildtyp Sequenz 24 auf. Die Induktionsstärken von S24mut5 und 9 sind signifikant niedriger zum Induktionsfaktor von S24, wobei S24mut5 einen stärkeren Effekt als S24mut9 aufweist.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die WT-Box GGACTTTC für die Aktivierung der Reportergenaktivität in Anwesenheit des murinen Transkriptionsfaktors NF-κB p65 in pflanzlichen Zellen notwendig ist.

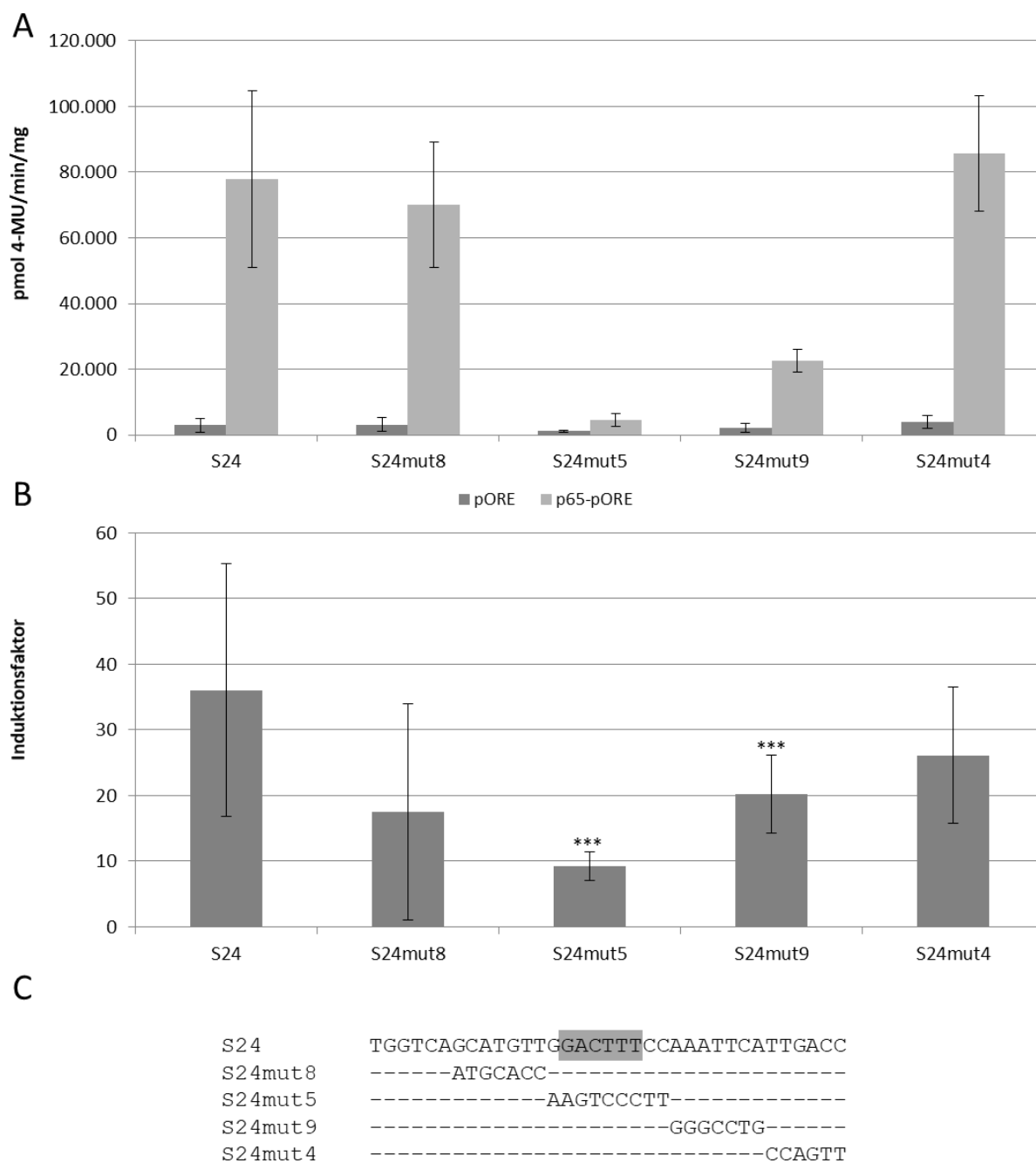


Abbildung 23: Die WT-Box in *cis*-Sequenz 24 ist verantwortlich für die NF- κ B p65 Aktivierung der Reporterexpression in Petersilienprotoplasten

A: Transienter Reportergen-Assay im Petersilienprotoplastensystem nach Kotransformation des NF- κ B p65 exprimierenden pORE Vektors als Effektor zusammen mit dem Reportergenplasmid pBT10GUS-d35SLUC (pBT10), welches ein Tetramer der *cis*-Sequenz 24 oder entsprechende Mutationen trägt. B: Vergleich der Induktionsstärke der unterschiedlichen Mutationen der *cis*-Sequenz 24 vermittelt durch NF- κ B p65. Die Berechnung der statistischen Unterschiede ist jeweils auf die Induktion von Sequenz 24 bezogen (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). C: Die Sequenzen von S24 und die verschiedenen Mutationen sind gezeigt. Unveränderte Nukleotide werden als – dargestellt, veränderte werden gezeigt. Die WT-Box ist grau hinterlegt. Die Ergebnisse der GUS-Aktivitäten und Induktionsfaktoren sind im Anhang in Tabelle 25 und Tabelle 26 aufgelistet.

4.1.7. MAMP- und NF- κ B p65-responsive Reportergenaktivitäten benötigen die WT-Box ähnliche Sequenz aus dem *PR1* Promotor

Der Promotor des *A. thaliana PR1* Gens enthält ein *cis*-Element, welches eine Ähnlichkeit zur NF- κ B Bindungsstelle aufweist (Lebel *et al.*, 1998). Diese Sequenz (GGACTTTT), nach der Mutation LS10 benannt, ist identisch mit der WT-Box GGACTTTT aus der *cis*-Sequenz 15, welche für eine NF- κ B p65 vermittelte Reportergenaktivität benötigt wird (Abbildung 20). Zur Analyse des Einflusses des Promotors *PR1* auf die MAMP- und NF- κ B p65-responsive Reportergenaktivität wurde der Promotorbereich -650 bis -600 bp upstream des ATG als Tetramer in den Reportergenvektor pBT10GUS-d35SLUC kloniert. In diesem Bereich liegen die durch Lebel *et al.* (1998) untersuchten *linker scanning* Mutanten LS7, LS8, LS9 und LS10, welche unterschiedliche *cis*-Elemente beinhalten. Diese Mutationen wurden ebenfalls als Tetramere in den Reportergenvektor pBT10GUS-d35SLUC kloniert und im Petersilienprotoplastensystem analysiert. In Abbildung 24 und Abbildung 25 sind die Ergebnisse der MAMP- und NF- κ B p65-Responsivität dargestellt.

In Abbildung 24 ist erkennbar, dass das unmutierte *cis*-regulatorische Modul PR1₆₅₀₋₆₀₀ eine MAMP-responsive Reportergenaktivität vermittelt. Dies kann ebenfalls bei den Mutanten LS7, LS8 und LS9 festgestellt werden. Nur LS10, in welcher die WT-Box GGACTTTT mutiert ist, zeigt keine gesteigerte GUS-Aktivität nach Pep25-Behandlung.

Dies verdeutlicht, dass der unmutierte Bereich von LS10, der die WT-Box GGACTTTT enthält, für eine Pep25-vermittelte Reportergenaktivität in Petersilienzellen essentiell ist.

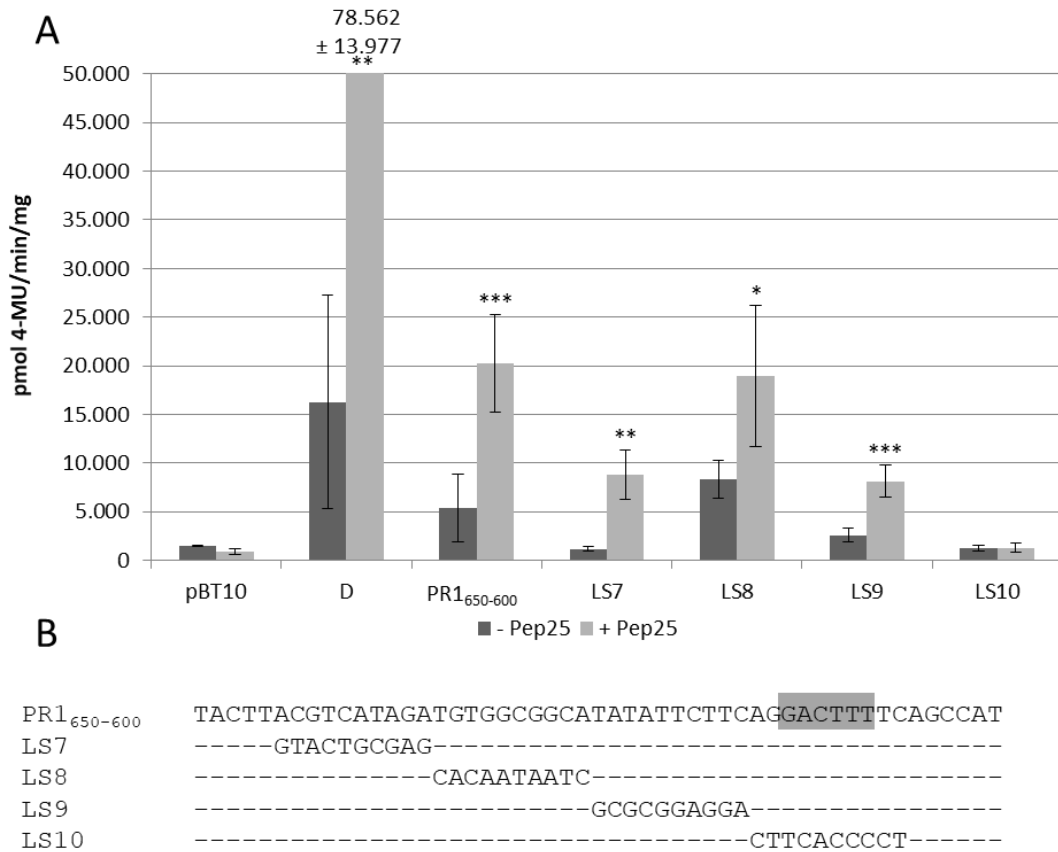


Abbildung 24: Die WT-Box in PR1₆₅₀₋₆₀₀ ist verantwortlich für eine Pep25 vermittelte Reporterexpression in Petersilienprotoplasten

A: Transienter Reporter-Gen-Assay in Petersilienprotoplasten nach Transformation und Behandlung mit oder ohne Pep25. Die Reporter-Gen-plasmide enthalten Tetramere des 650-600 bp Fragments des *PR1* Promotors und die entsprechenden Mutationen LS7, 8, 9 und 10. Der leere pBT10 Vektor dient als negativ Kontrolle der Pep25-Behandlung, hingegen dient der Reporter-Gen-vektor mit einem Tetramer des D-Elements (D) als positiv Kontrolle. Die Berechnung der statistischen Unterschiede ist jeweils auf Pep25-behandelte bzw. unbehandelte Proben bezogen (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). B: Die Sequenz von PR1₆₅₀₋₆₀₀ und die verschiedenen Mutationen sind gezeigt. Unveränderte Nukleotide werden als – dargestellt, veränderte werden gezeigt. Die WT-Box ist grau hinterlegt. Die Ergebnisse der GUS-Aktivitäten sind im Anhang in Tabelle 27 aufgeführt.

Zur Analyse der Aktivierung der PR1₆₅₀₋₆₀₀-vermittelten Reporterexpression durch den murinen NF- κ B p65, wurden Kotransformationsexperimente in Petersilienprotoplasten durchgeführt (Bachelorarbeit Anika Möller, 2017). Abbildung 25 zeigt die NF- κ B vermittelten Reporteraktivitäten (A) und entsprechende Induktionsfaktoren (B). NF- κ B p65 aktiviert die Reporterexpression vermittelt durch die Promotorkonstrukte PR1₆₅₀₋₆₀₀, LS7, LS8 und LS9 (Abbildung 25A). Im Gegensatz dazu kann keine gesteigerte GUS-Aktivität vermittelt durch LS10 in Anwesenheit von NF- κ B p65 beobachtet werden. LS7 und LS8 zeigen eine Induktionsstärke stärker oder vergleichbar mit dem *PR1* Promotorfragment (Abbildung 25B). Die Induktionsfaktoren von LS9 und LS10 sind signifikant geringer im Vergleich zum *PR1* Promotorfragment.

Dies zeigt, dass die vorhergesagte NF- κ B Bindestelle GGACTTTT funktionell für die NF- κ B p65 vermittelte Reporterexpression ist.

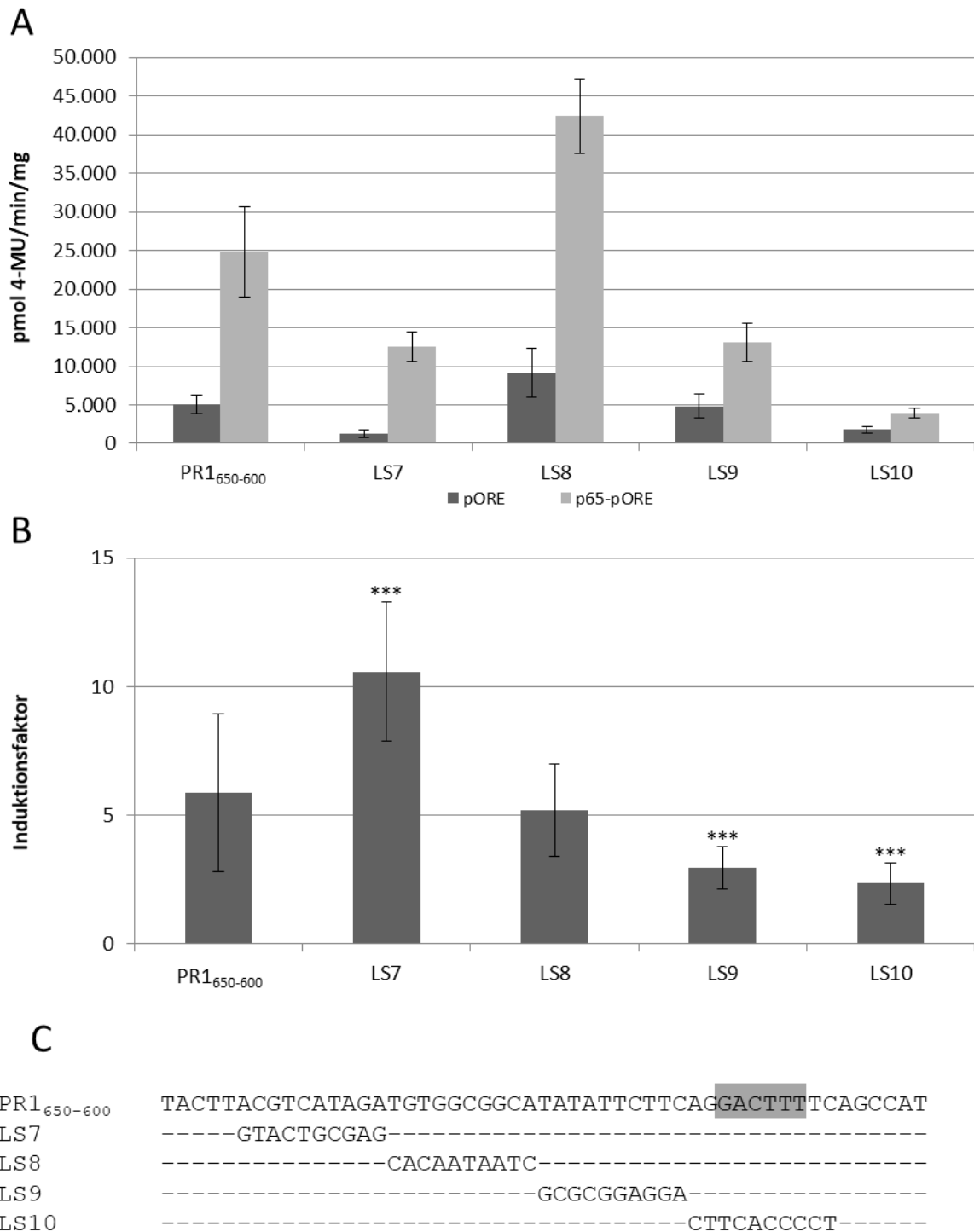


Abbildung 25: Die WT-Box in PR1₆₅₀₋₆₀₀ ist verantwortlich für die NF-κB p65 aktivierte Reporterexpression in Petersilienprotoplasten

A: Transienter Reporter-Gen-Assay im Petersilienprotoplastensystem nach Kotreformation mit dem NF-κB p65 exprimierenden pORE Vektors als Effektor zusammen mit den Reporter-Gen-Plasmiden des 650-600 bp Fragments des *PR1* Promotors und die entsprechenden Mutationen LS7, 8, 9 und 10. B: Vergleich der Induktionsstärke der unterschiedlichen Mutationen des *PR1* Promotorfragments vermittelt durch NF-κB p65. Die Berechnung der statistischen Unterschiede ist jeweils auf die Induktion des Promotorfragments PR1₆₅₀₋₆₀₀ bezogen (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). C: Die Sequenz von PR1₆₅₀₋₆₀₀ und die verschiedenen Mutationen sind gezeigt. Unveränderte Nukleotide werden als – dargestellt, veränderte werden gezeigt. Die WT-Box ist grau hinterlegt. Die Ergebnisse der GUS-Aktivitäten und Induktionsfaktoren sind im Anhang in Tabelle 28 und Tabelle 29 aufgeführt.

4.1.8. Die WT-Boxen sind notwendig für die MAMP-responsive Genexpression in *Arabidopsis thaliana* Protoplasten

Bisher wurde nur im Petersilienprotoplastensystem gezeigt, dass die WT-Boxen GGACTTTT, GGACTTTG, AGACTTTT und GGACTTTC in den *cis*-Sequenzen 15, 18 und 24 für eine MAMP-responsive Genexpression notwendig sind (Lehmeyer *et al.*, 2016; Abbildung 21; Kanofsky *et al.*, 2017). Des Weiteren konnte in transgenen *A. thaliana* Pflanzen gezeigt werden, dass Sequenz 15 eine spezifische Reporter-genaktivität nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 und *Botrytis cinerea* (B1.05) und auch nach Behandlung mit Salicylsäure aufweist (Lehmeyer *et al.*, 2016). Die Notwendigkeit der WT-Boxen in diesen Sequenzen für eine MAMP-Responsivität in *A. thaliana* wurde bisher nicht gezeigt.

Zur Untersuchung des Einflusses der WT-Box aus den *cis*-Sequenzen 15, 18 und 24 auf eine MAMP-responsive Reporter-genaktivität in *A. thaliana* Protoplasten wurden diese Sequenzen und entsprechende Mutationen in den Vektor pBT10-LUC upstream eines Minimalpromotors und LUC-Reportergens kloniert. Ein zweites Plasmid, welches konstitutiv GUS exprimiert, dient als Transformationskontrolle. Das Oligopeptid flg22 wurde als MAMP verwendet. Der leere pBT10-LUC Vektor sowie das Tetramer des D-Elements im pBT10-LUC dienen als negativ und positiv Kontrolle für die flg22-Behandlung (Bachelorarbeit Alexander Sandmann, 2017).

Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse der Reporter-genaktivitäten der Kotransformationen. Die *cis*-Sequenzen 15 und 24 weisen flg22-responsive Reporter-genaktivität in *A. thaliana* Protoplasten auf (Abbildung 26A und C). Hingegen kann keine flg22-induzierte Reporter-genexpression durch S18 vermittelt werden (Anhang: Tabelle 32). Mutationen in jeweils einer WT-Box in S15 (S15mut4 und S15mutd) zerstören die flg22-responsive Genexpression, während eine Mutation zwischen beiden WT-Boxen (S15mut5) flg22-vermittelte Reporter-genaktivität aufweist, die im Vergleich zum Wildtyp jedoch geringer ausfällt (Abbildung 26A). Eine Mutation in der WT-Box aus Sequenz 24 (S24mut5) zerstört ebenfalls flg22-vermittelte Reporter-genaktivität, während eine angrenzende Mutation (S24mut9) eine Reporter-genaktivität auf einem niedrigen Level vermittelt (Abbildung 26C).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die WT-Boxen in den *cis*-Sequenzen 15 und 24 notwendig sind für eine MAMP-responsive Genexpression in *A. thaliana*.

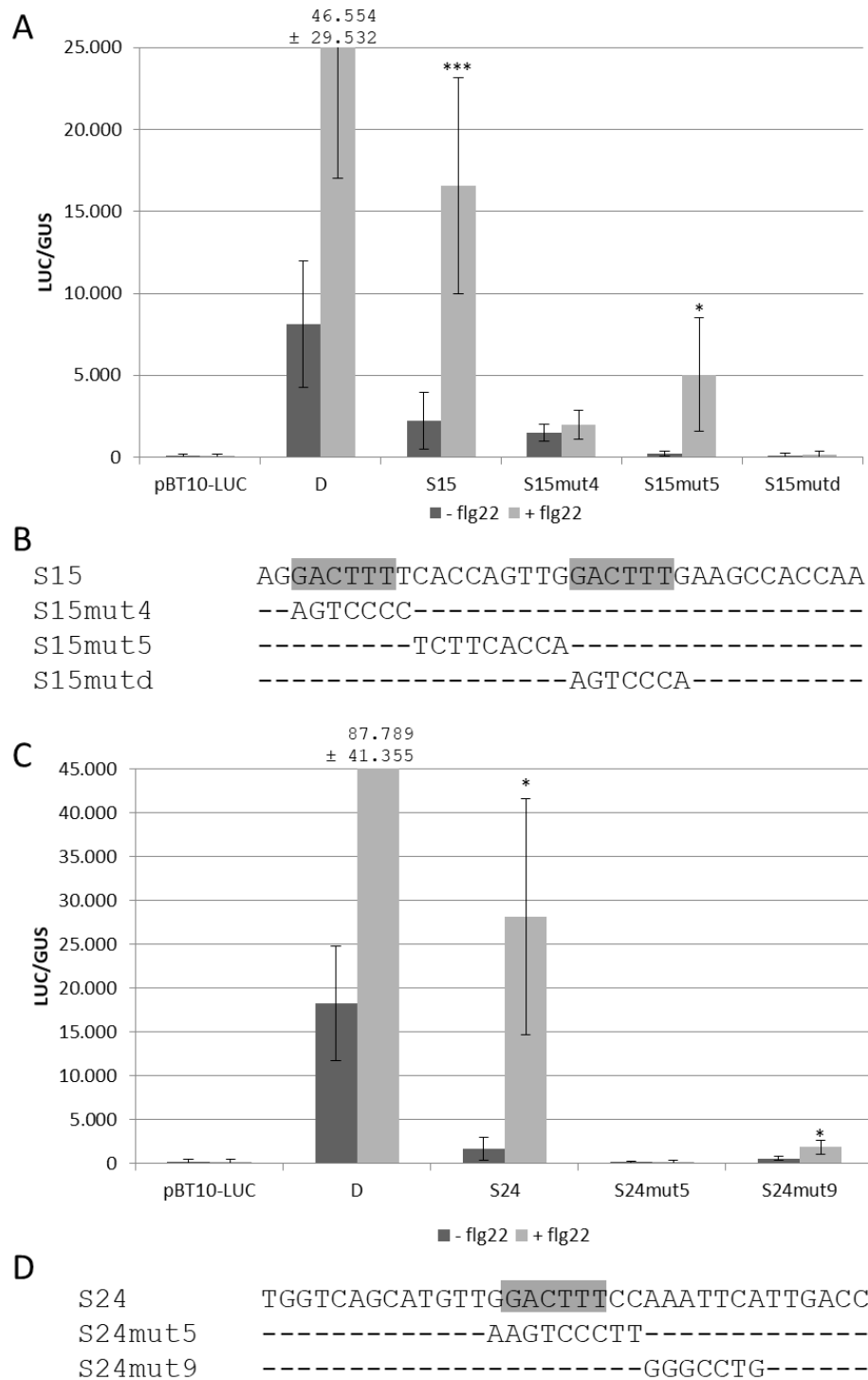


Abbildung 26: Die WT-Boxen sind notwendig für eine flg22-induzierte Reporterogenaktivität in *Arabidopsis thaliana* Protoplasten

Transienter Reportergen-Assay nach Transformation und flg22-Behandlung von *Arabidopsis thaliana* Protoplasten. Die in der Transformation verwendeten Plasmide enthalten Tetramere der *cis*-Sequenzen 15 (A) und 24 (C), sowie entsprechende Mutationen upstream des LUC Reportergens im pBT10-LUC Vektor. Der leere pBT10-LUC dient als negativ Kontrolle, wohingegen der Vektor mit einem Tetramer des D-Elements (D) als positiv Kontrolle der flg22-Behandlung dient. Zur Normierung der LUC-Aktivität wurde die konstitutiv exprimierte GUS-Aktivität des Vektors pRT103-GUS verwendet. Die Berechnung der statistischen Unterschiede ist jeweils auf flg22-behandelte bzw. unbehandelte Proben bezogen (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). B und D: Die Sequenzen der *cis*-Elemente 15 und 24 sowie die entsprechenden Mutationen sind aufgelistet. Nur veränderte Nukleotide sind gezeigt, unveränderte werden als – dargestellt. Die WT-Boxen sind grau hinterlegt. Im Anhang in Tabelle 30 und Tabelle 31 sind die entsprechenden LUC-Aktivitäten aufgelistet.

4.1.9. Untersuchung der NF- κ B p65 vermittelten Reporterexpression in *Arabidopsis thaliana*

Bisher wurde nur in Petersilienprotoplasten gezeigt, dass NF- κ B p65 die Reporterexpression über Tetramere der *cis*-Sequenz 24 vermitteln kann (4.1.6). Die *cis*-Sequenz 24 ist im Promotor von *WRKY30* (AT5G24110) in *A. thaliana* vorhanden. In Kotransformationsexperimenten mit NF- κ B p65 zusammen mit dem Tetramer von Sequenz 24 und dem nativen *WRKY30*-Promotor sollte analysiert werden, ob NF- κ B p65 eine Expression über den synthetischen bzw. nativen *WRKY30*-Promotor auch in *A. thaliana* regulieren kann. Dazu wurde das Promotorfragment im Bereich von -230 bp bis zum ATG von *WRKY30* ohne den Minimalpromotor vor das LUC-Reporter in den pBT10-LUC Vektor kloniert (S1; Kanofsky *et al.*, 2017). Zum Vergleich der Expressionsstärke wurden die verschiedenen Reporterkonstrukte zusammen mit dem NF- κ B p65 exprimierenden bzw. nicht exprimierenden pORE in *A. thaliana* Protoplasten transformiert (Masterarbeit Lena Meißner, 2018).

In Abbildung 27 ist das Ergebnis der gemessenen GUS-Aktivitäten (A) und die Induktionsfaktoren (B) der Kotransformation aufgeführt. Der leere pBT10-LUC Vektor zeigt keine gesteigerte Reporteraktivität in Anwesenheit von NF- κ B p65, hingegen kann eine gesteigerte LUC-Aktivität durch das Tetramer der *cis*-Sequenz 24 vermittelt werden (Abbildung 27A). Der native Promotor von *WRKY30* (S1) zeigt in Anwesenheit von NF- κ B p65 eine sehr geringe Reporteraktivität. Diese ist vergleichbar mit der LUC-Aktivität des leeren pBT10-LUC Vektors. Im Vergleich der Induktionsstärken vom synthetischen und nativen Promotor wird der synthetische Promotor um mehr als das Doppelte durch NF- κ B p65 induziert (Abbildung 27B).

Dieses Ergebnis zeigt, dass NF- κ B p65 die Reporterexpression durch das Tetramer von Sequenz 24 verstärkt reguliert, wohingegen die Expression des Reporters vermittelt durch den nativen *WRKY30*-Promotor nur sehr schwach reguliert wird.

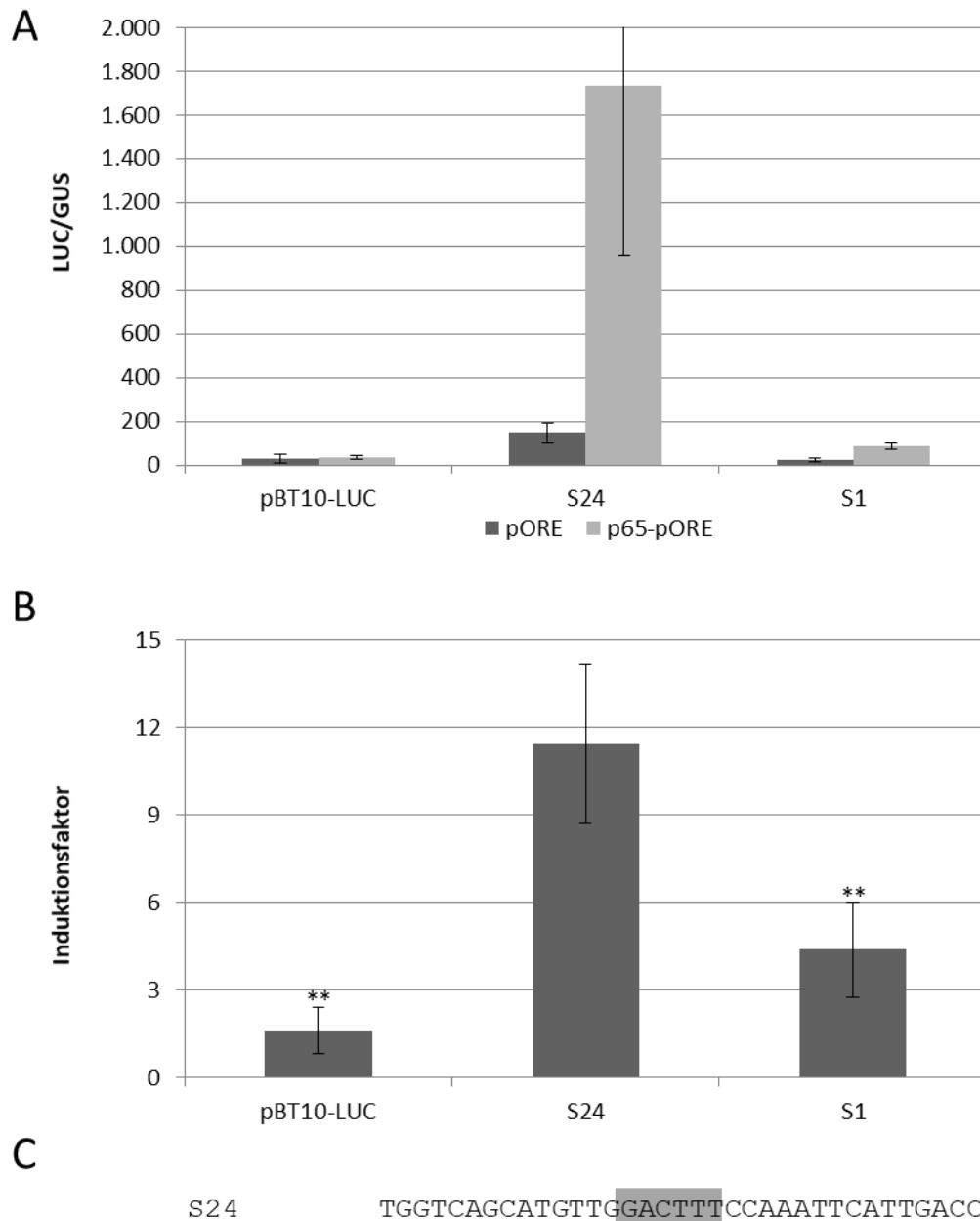


Abbildung 27: Die NF-κB p65 regulierte Reporteraktivität vermittelt durch den nativen *WRKY30*-Promotor ist sehr gering

A: Transienter Reporter-Gen-Assay in *A. thaliana* Protoplasten nach Kotreformation des NF-κB p65 exprimierenden pORE Vektors als Effektor zusammen mit dem Reporter-Gen-Plasmid pBT10-LUC, welches ein Tetramer der *cis*-Sequenz 24 oder den nativen *WRKY30*-Promotor (S1) enthält. B: Vergleich der Induktionsfaktoren der synthetischen und nativen Promotoren vermittelt durch NF-κB p65. Die Berechnung der statistischen Unterschiede ist jeweils auf die Induktion des Tetramers von Sequenz 24 bezogen (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). C: Nukleotidabfolge von Sequenzen 24. Die WT-Box ist grau hinterlegt. Die W-Boxen (GGTCA und TTGACC) sind unterstrichen. Die gemessenen GUS-Werte und Induktionsfaktoren sind im Anhang in Tabelle 33 und Tabelle 34 aufgelistet.

Um den generellen Einfluss von NF-κB p65 in *A. thaliana* Pflanzen zu untersuchen, wurden stabil transformierte *A. thaliana* Linien erstellt. Dazu wurde die cDNA von NF-κB p65 in den T-DNA Vektor UBQ10_XVE_MSC_HA_Bar kloniert (3.15.30) und über Floral Dip (3.15.7) stabil in das Genom von *A. thaliana* integriert. Das Vektorkonstrukt ermöglicht eine Regulation der NF-κB p65-Expression durch das Hormon β -Estradiol. Drei unabhängige transgene Linien wurden erstellt und analysiert. Im Anhang

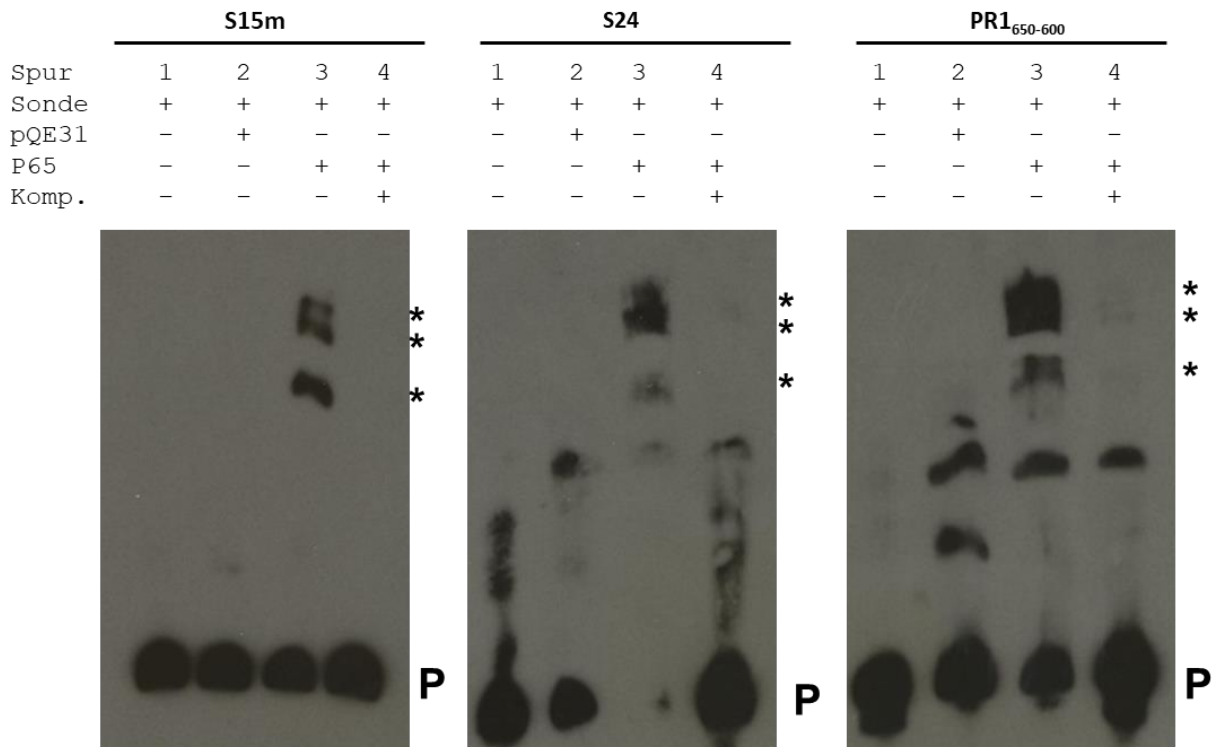
unter 8.5 befindet sich die Charakterisierung der verschiedenen transgenen Pflanzen. Die unterschiedlichen Linien zeigen eine β -Estradiol vermittelte NF- κ B p65 Transkription, jedoch kann im Western Blot kein Protein nachgewiesen werden. Außerdem kann keine durch β -Estradiol induzierte NF- κ B p65 vermittelte Transkription von potentiellen Zielgenen, die die *cis*-Sequenzen 15, 18 und 24 sowie *PR1* und fünf weitere Gene, die potentielle NF- κ B p65 Bindestellen nach Kusch *et al.* (1992) enthalten, in semiquantitativen PCRs festgestellt werden (Anhang: Abbildung 43). Diese Ergebnisse könnten durch einen Fehler in der Translation von NF- κ B p65 in diesen *A. thaliana* Linien begründet werden oder durch eine zu geringe Translation von NF- κ B p65, wodurch das Protein im Western Blot nicht nachgewiesen werden konnte und die Proteinmenge für eine Regulation der Translation nicht ausreichend sein könnte.

4.1.10. NF- κ B p65 bindet *in vitro* direkt an die WT-Box beinhaltenden synthetischen Promotoren

Im Petersilienprotoplastensystem konnte gezeigt werden, dass die WT-Box in den synthetischen Promotoren für eine NF- κ B p65 vermittelte Reportergenaktivität notwendig ist (4.1.4 - 4.1.7). Zur Untersuchung einer direkten Interaktion von NF- κ B p65 mit den verschiedenen *cis*-Sequenzen wurden EMSA Experimente durchgeführt. Dafür wurde die cDNA von NF- κ B p65 in einen *E. coli* Expressionsvektor kloniert (3.15.31), das Protein überexprimiert und aufgereinigt (3.15.43). Die zu untersuchenden *cis*-Sequenzen wurden mit Biotin markiert (3.15.19) und zusammen mit dem aufgereinigten Protein im EMSA eingesetzt (3.15.45).

Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse mit den *cis*-Sequenzen 15, 24 und PR1₆₅₀₋₆₀₀. Die Spur 1 zeigt die Ergebnisse der markierten Sonde (P) ohne Protein. In Spur 2 sind die Ergebnisse der markierten Sonde mit aufgereinigtem Proteinextrakt aus *E. coli* dargestellt, welcher kein NF- κ B p65 exprimiert. Während bei S15 keine weiteren Banden detektiert werden, zeigen S24 und PR1₆₅₀₋₆₀₀ unspezifische Banden. Spur 3 zeigt die Ergebnisse, wenn aufgereinigtes NF- κ B p65 zur markierten Sonde hinzugefügt wurde. In allen drei Experimenten können mehrere Shifts (*) detektiert werden, die durch einen 500-fachen molaren Überschuss an unmarkierter DNA, welche aus der gleichen Sequenz der markierten Sonde besteht, kompetiert werden (Spur 4). Im Anhang unter 8.7 befinden sich zwei unabhängige Wiederholungen des EMSA Experiments mit gleichen Ergebnissen.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass NF- κ B p65 *in vitro* spezifisch an die WT-Box beinhaltenden Sequenzen 15, 24 und PR1₆₅₀₋₆₀₀ bindet.



S15m AGGACTTTTCACCAGTTGGACTTTGGGATTGTTGG
 S24 TGGTCAGCATGTTGGACTTTCCAAATTCATTGACC
 PR1₆₅₀₋₆₀₀ TACTTACGTCATAGATGTGGCGGCATATATTCTTCAGGACTTTTCAGCCAT

Abbildung 28: NF-κB p65 bindet *in vitro* an die WT-Box beinhaltenden Sequenzen 15, 24 und PR1₆₅₀₋₆₀₀

EMSA mit NF-κB p65 und den *cis*-Sequenzen 15, 24 und PR1₆₅₀₋₆₀₀. Über den einzelnen Experimenten sind die Sequenzen angegeben, welche als Sonden und Kompetitoren verwendet wurden. 1: markierte Sonde. 2: markierte Sonde mit aufgereinigtem Proteinextrakt aus *E. coli*, welcher kein NF-κB p65 exprimiert. 3: markierte Sonde mit aufgereinigtem NF-κB p65. 4: markierte Sonde mit aufgereinigtem NF-κB p65 und unmarkierte Kompetitor-DNA in 500x molarem Überschuss. Mit P ist die Position der markierten Sonde markiert. * zeigt die spezifischen DNA-Protein Komplexe an. Die Sequenzen S15m, S24 und PR1₆₅₀₋₆₀₀ sind aufgeführt.

4.1.11. Die WT-Boxen werden für eine direkte Interaktion von NF-κB p65 mit den synthetischen Promotoren benötigt

Zur Analyse des Einflusses der WT-Boxen auf die direkte Interaktion mit NF-κB p65 wurden EMSA Experimente von NF-κB p65 mit den *cis*-Sequenzen 15 und 24, sowie dem Promotorfragment PR1₆₅₀₋₆₀₀ und verschiedenen Mutationen der entsprechenden Sequenzen als Kompetitor verwendet (Masterarbeit Claudia Janina Strauch, 2018).

In Abbildung 29 sind die Ergebnisse des EMSA Assays mit NF-κB p65 und den *cis*-Sequenzen 15 (A), 24 (B) und dem Promotorfragment PR1₆₅₀₋₆₀₀ (C) gezeigt.

In Abbildung 29A ist das Ergebnis des EMSA Assays mit NF-κB und der *cis*-Sequenz 15 als markierte Sonde gezeigt. Die Spur 1 zeigt das Ergebnis der markierten Sonde (P) ohne Protein. In Spur 2 wurde die markierte Sonde mit aufgereinigtem Proteinextrakt aus *E. coli*, in welchem kein NF-κB p65 vorhanden ist, verwendet. Ein Hintergrundsignal kann neben der freien Sonde detektiert werden. Spur 3 zeigt das Ergebnis, wenn aufgereinigtes NF-κB p65 zur markierten Sonde hinzugefügt wurde. Mehrere Shifts (*), die eine andere Höhe im Vergleich zum Hintergrundsignal aufweisen, können detektiert werden (Spur 2). Wurden als Kompetitoren eine Mutation zwischen beiden WT-Boxen (mut5, Spur 4) und eine Mutation in der zweiten WT-Box (mutd, Spur 6) im 2000-fachen molaren Überschuss verwendet, wird der Shift sehr stark abgeschwächt. Wird ein Kompetitor verwendet, der eine Mutation in der ersten WT-Box trägt (mut4, Spur 5 und mut12, Spur 7), kann ein Shift detektiert werden. Der EMSA Assay zeigt, dass für eine direkte Interaktion von NF-κB p65 mit Sequenz 15 die erste WT-Box GGACTTTT benötigt wird. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung, dass die erste WT-Box in Sequenz 15 hauptsächlich für die NF-κB p65 vermittelte Reportergenaktivität in Petersilienzellen verantwortlich ist (Abbildung 20).

Der EMSA Assay mit NF-κB und der *cis*-Sequenz 24 als markierte Sonde ist in Abbildung 29B dargestellt. Die Spur 1 zeigt das Ergebnis der markierten Sonde (P) ohne Protein. In Spur 2 ist das Ergebnis der markierten Sonde mit aufgereinigtem Proteinextrakt aus *E. coli*, in welchem kein NF-κB p65 vorhanden ist, dargestellt. Neben der freien Sonde kann ein Hintergrundsignal detektiert werden. Spur 3 zeigt das Ergebnis, wenn aufgereinigtes NF-κB p65 zur markierten Sonde hinzugefügt wurde. Es können mehrere Shifts (*) detektiert werden, die eine andere Höhe im Vergleich zum Hintergrundsignal aufweisen (Spur 2). Diese können durch einen 2000-fachen molaren Überschuss an unmarkierter DNA, welche aus der gleichen Sequenz der markierten Sonde besteht, kompetiert werden (Spur 4). In den Spuren 5, 6 und 7 wurden verschiedene Kompetitoren verwendet, sodass bestimmt werden kann, an welche Box NF-κB p65 in Sequenz 24 bindet. Kompetitorsequenzen, in denen beide W-Boxen mutiert sind, kompetieren die spezifischen Shifts (Spur 5). Hingegen können die Shifts zwischen NF-κB p65 und der Biotin-markierten Sequenz 24 mit der Mutante in der WT-Box (S24mut5, Spur 6) und der dreifach Mutante S24mut7 (Spur 7) nicht kompetiert werden. Der EMSA Assay zeigt, dass die WT-Box GGACTTTC für eine direkte Bindung von NF-κB p65 an Sequenz 24 benötigt wird. Diese Ergebnisse decken sich mit der Beobachtung, dass die WT-Box in der *cis*-Sequenz 24 für eine NF-κB p65 vermittelte Reportergenexpression in pflanzlichen Zellen benötigt wird (Abbildung 23).

In Abbildung 29C ist das Ergebnis des EMSA Assays mit NF-κB p65 und dem Promotorfragment PR1₆₅₀₋₆₀₀ als markierte Sonde dargestellt. Die Spur 1 zeigt das Ergebnis der markierten Sonde (P) ohne Protein.

In Spur 2 wurde die markierte Sonde mit aufgereinigtem Proteinextrakt aus *E. coli*, in welchem kein NF-κB p65 vorhanden ist, verwendet. Kein Shift neben der freien Sonde kann detektiert werden. Spur 3 zeigt das Ergebnis, wenn NF-κB p65 zur markierten Sonde hinzugefügt wurde. Mehrere Shifts (*) können detektiert werden. Wurde das PR1₆₅₀₋₆₀₀ Promotorfragment als unmarkierter Kompetitor im 2000-fach molaren Überschuss im Ansatz hinzugefügt, kann kein Shift mehr detektiert werden (Spur 4). Der Kompetitor LS10, in dem die WT-Box GGACTTTT mutiert ist, kann die NF-κB p65 Bindung nicht kompetieren (Spur 5). Das Ergebnis des EMSA Assays, dass die WT-Box im PR1 Promotorfragment für eine Regulation mit NF-κB p65 benötigt wird, deckt sich mit dem transienten Reporter Assay (Abbildung 25). Im Anhang unter 8.7 befinden sich zwei unabhängige Wiederholungen der EMSA Experimente mit gleichen Ergebnissen.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass NF-κB p65 *in vitro* an die WT-Boxen GGACTTTT, GGACTTTC und GGACTTTT in den *cis*-Sequenzen 15 und 24, sowie an die WT-Box aus dem PR1₆₅₀₋₆₀₀ Promotorfragment bindet.

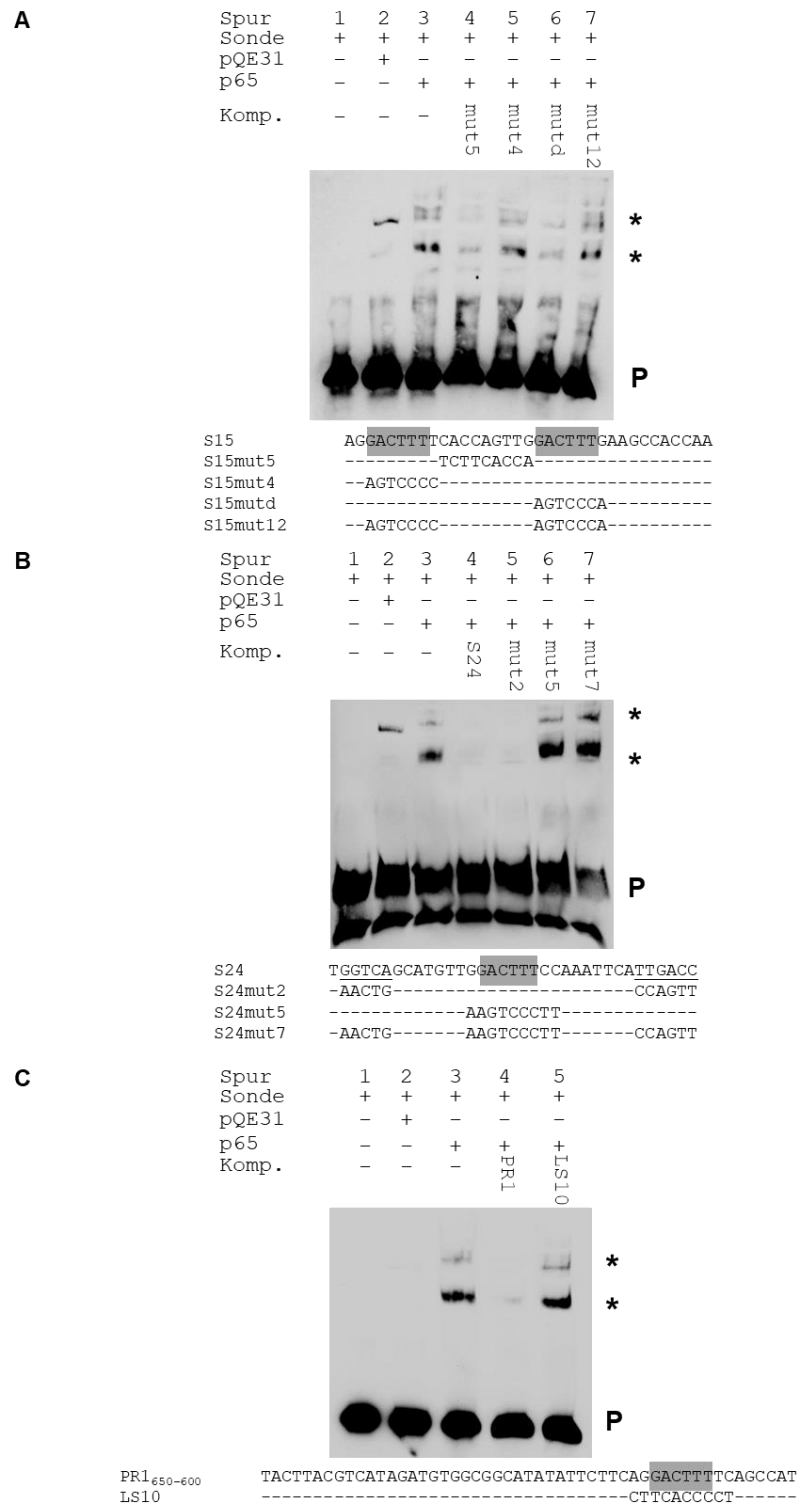


Abbildung 29: NF- κ B p65 bindet *in vitro* abhängig der WT-Boxen an die Sequenz 15, 24 und PR1₆₅₀₋₆₀₀

EMSA mit NF- κ B p65 und Biotin-markierter *cis*-Sequenz 15 (A) 24 (B) und PR1₆₅₀₋₆₀₀ (C) als Sonde. 1: markierte Sonde. 2: markierte Sonde mit aufgereinigtem Proteinextrakt aus *E. coli*, welcher kein NF- κ B p65 exprimiert. 3: markierte Sonde mit aufgereinigtem NF- κ B p65. 4 – 7: markierte Sonde mit aufgereinigtem NF- κ B p65 und verschiedenen Sequenzen als unmarkierter Kompetitor in 2000x molarem Überschuss. Mit P ist die Position der markierten Sonde markiert. * zeigt die spezifischen DNA-Protein Komplexe an. Die Sequenzen und entsprechenden verschiedenen Mutationen der Sequenz sind aufgeführt. Veränderte Nukleotide der Mutationen werden gezeigt; unveränderte werden nicht gezeigt (-). Die W-Boxen (GGTCA und TTGACC) sind unterstrichen und die WT-Boxen (GACTTT) sind grau hinterlegt.

4.2. Analyse der mit Sequenz 24 interagierenden WRKY Faktoren

Im vorangegangenen Kapitel 4.1 wurde gezeigt, dass der murine Transkriptionsfaktor NF- κ B p65 mit den WT-Boxen interagiert. Da die analysierten WT-Boxen aus Promotoren von Genen aus *A. thaliana* stammen, ist es von Interesse pflanzliche WT-Box interagierende Faktoren zu identifizieren. Dabei hat die *cis*-Sequenz 24 aufgrund der besonders signifikanten Interaktion mit NF- κ B p65 durch die footprintDB Datenbank (Tabelle 10) eine besondere Bedeutung. In vorhergehenden Untersuchungen der Sequenz 24 konnte gezeigt werden, dass die beiden W-Boxen und die WT-Box für die Pep25-Responsivität verantwortlich sind (Kanofsky *et al.*, 2017). Über einen Yeast One-Hybrid Screen konnten WRKY26, 40, 41 und 70 als Interaktionspartner mit diesem *cis*-Element identifiziert werden (Kanofsky *et al.*, 2017). Durch weitere Analysen wurde nachgewiesen, dass in Hefezellen WRKY40 und 70 für eine durch Sequenz 24 vermittelte Reporterogenaktivität die beiden W-Boxen aber nicht die WT-Box benötigen, während WRKY26 und 41 eine Kombination aus W- und WT-Boxen dafür bedürfen. In Petersilienprotoplasten wurde die Regulation von WRKY70 bereits untersucht. Zur Aktivierung der WRKY70 vermittelten Reporterogenaktivität sind die W-Boxen erforderlich (Kanofsky *et al.*, 2017). Im Folgendem werden die Ergebnisse zum Einfluss von WRKY26, 40 und 41 auf die Sequenz 24 vermittelte Reporterogenaktivität in Pflanzenzellen vorgestellt.

4.2.1. WRKY26, 40 und 41 reprimieren die Sequenz 24 regulierte Reporterogenaktivität

Zur Bestimmung des Einflusses von WRKY26, 40 und 41 auf die Sequenz 24 vermittelte Reporterogenaktivität wurde das Petersilienprotoplastensystem verwendet. Die cDNAs der unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren wurden dazu in den pflanzlichen Expressionsvektor pORE kloniert und zusammen mit den Reportergenplasmiden, die das Tetramer von *cis*-Sequenz 24 enthalten, kotransformiert. In Abbildung 30 sind die verschiedenen Ergebnisse dargestellt (Masterarbeit Ann-Kathrin Bahlmann, 2017).

Eine Kotransformation mit WRKY26, 40 und 41 als Effektoren zusammen mit dem Sequenz 24 Reportergenkonstrukt zeigt keine gesteigerte Reporterogenaktivität in Abwesenheit des MAMP Pep25 (Abbildung 30; Vergleiche S24 + pORE - Pep25 mit S24 + WRKY26/40/41-pORE - Pep25). Dies verdeutlicht, dass die drei WRKY Faktoren nicht als Aktivatoren die Sequenz 24 vermittelte Reporterogenaktivität regulieren. Die durch Pep25-induzierte Sequenz 24 vermittelte Reporterogenaktivität ist in Anwesenheit von WRKY26, 40 und 41 geringer als bei deren Abwesenheit (Abbildung 30; Vergleiche S24 + pORE + Pep25 mit S24 + WRKY26/40/41-pORE + Pep25).

Dies zeigt, dass die drei WRKY Faktoren WRKY26, 40 und 41 als Repressoren die Sequenz 24 vermittelte Reporterexpression regulieren.

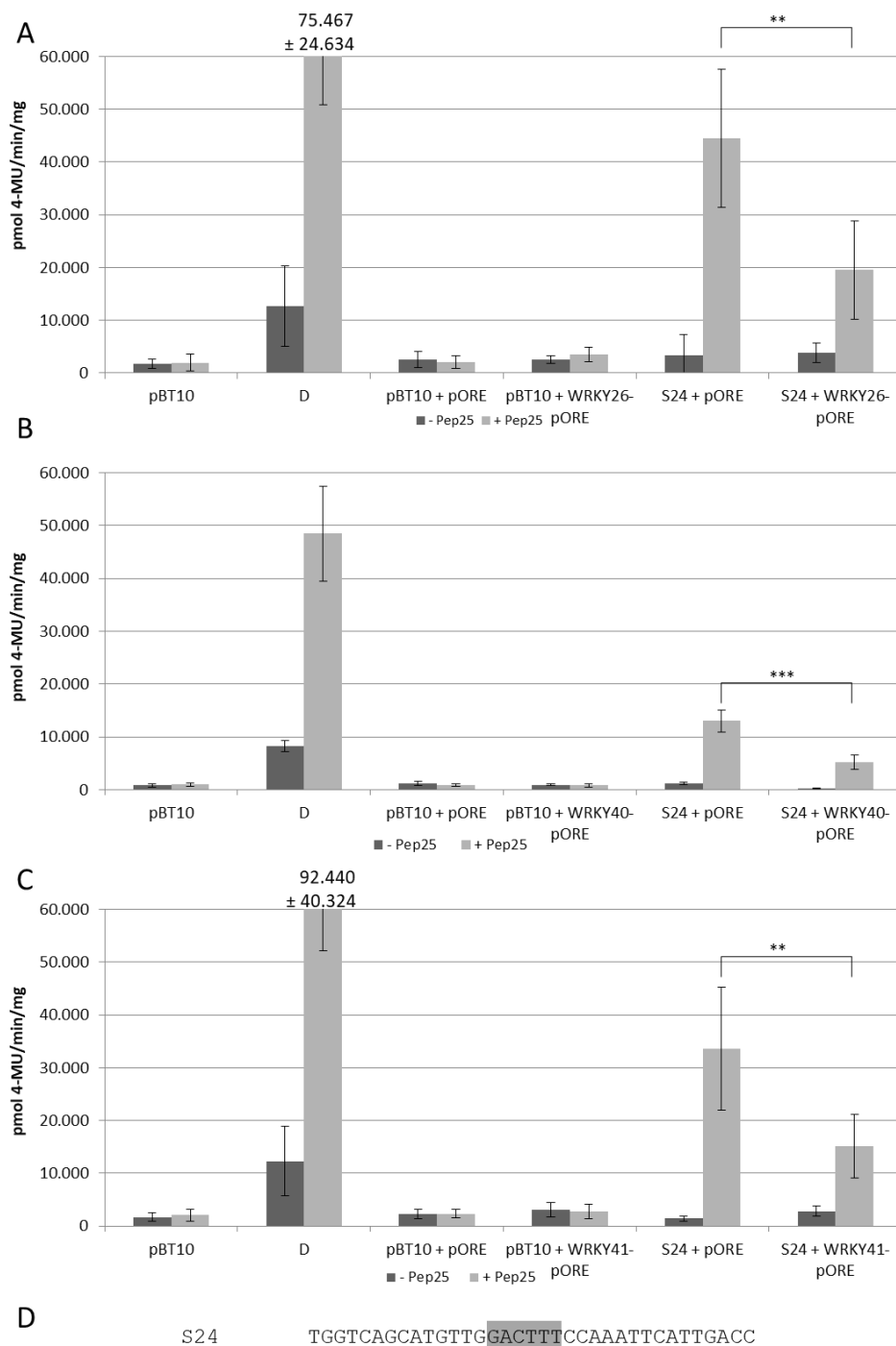


Abbildung 30: WRKY26, 40 und 41 reprimieren die MAMP-responsive Reporterexpression

Transienter Reporter-Gen-Assay in Petersilienprotoplasten nach Kotransformation des Reporter-Gen-Plasmides mit dem Tetramer der Sequenz 24 (S24) und dem WRKY26 (A), WRKY40 (B) und WRKY41 (C) exprimierenden oder nicht exprimierenden Plasmids in An- oder Abwesenheit von Pep25. Der leere Reporter-Gen-Vektor (pBT10) und der D-Element beinhaltende Vektor (D) dienen als negativ und positiv Kontrolle der Pep25-Behandlung. Die Berechnung der statistischen Unterschiede ist jeweils auf die GUS-Aktivität der Kotransformation des entsprechenden WRKY Faktor exprimierenden bzw. nicht exprimierenden pORE Vektors mit Pep25-Behandlung bezogen (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). D: Nukleotidabfolge von Sequenz 24. Unterstrichen sind die W-Boxen (GGTCA und TTGACC) und die WT-Box (GACTTT) ist grau hinterlegt. Die entsprechenden Werte zur Abbildung sind im Anhang in Tabelle 35, Tabelle 36 und Tabelle 37 aufgeführt.

4.2.2. WRKY41AD reguliert die Sequenz 24 vermittelte Reporterogenaktivität unabhängig der WT-Box in Pflanzenzellen

WRKY41 reprimiert die Sequenz 24 vermittelte Reporterogenaktivität in pflanzlichen Zellen (Abbildung 30). Um den Einfluss der W-Boxen und der WT-Box innerhalb der Sequenz 24 auf die WRKY41-regulierte Genexpression zu bestimmen, muss der Repressor WRKY41 in einen Aktivator umgewandelt werden. Über Vergleiche von Reportergenexpressionen, die durch unterschiedliche Mutationen innerhalb von Sequenz 24 und dem aktivierenden WRKY41 vermittelt werden, kann der WRKY41 responsive Bereich ermittelt werden. Zur Umwandlung in einen Aktivator wurde die Aktivierungsdomäne des Hefetranskriptionsfaktors GAL4 N-terminal an WRKY41 kloniert. Der Aktivator wird darauf als WRKY41AD bezeichnet. Im Petersilienprotoplasten wurden mit WRKY41AD und den verschiedenen Reportergenkonstrukten Kotransformationsexperimente durchgeführt.

In Abbildung 31 sind die Ergebnisse der WRKY41AD Regulation vermittelt durch Sequenz 24 dargestellt (Masterarbeit Ann-Kathrin Bahlmann, 2017). In Abbildung 31A sind die gemessenen Reportergenaktivitäten und in Abbildung 31B die entsprechenden Induktionsfaktoren gezeigt.

Abbildung 31A zeigt, dass WRKY41AD die Sequenz 24 vermittelte Reportergenexpression aktiviert (S24), somit ist die Umwandlung von WRKY41 in einen Aktivator erfolgreich. Zur Bestimmung des Einflusses der verschiedenen Boxen auf die WRKY41 Regulation, wurden verschiedene Mutationen der Sequenz 24 mit WRKY41AD analysiert. Eine Doppelmutante in beiden W-Boxen (S24mut2) zeigt keine gesteigerte GUS-Aktivität im Vergleich zum leeren pORE Vektor. Die einzelnen Mutationen in den W-Boxen (S24mut4 und S24mut6) reduzieren die WRKY41AD vermittelte Reportergenaktivität auf ein ähnliches Level. Eine Mutation in der WT-Box (S24mut5) zeigt eine GUS-Aktivität vergleichbar mit der Wildtyp Sequenz 24. Eine dreifache Mutante in beiden W-Boxen und der WT-Box (S24mut7) vermittelt, ähnlich der Doppelmutante (S24mut2), keine gesteigerte GUS-Aktivität im Vergleich zum leeren pORE Vektor.

Im Vergleich der Induktionsstärke vermittelt durch die verschiedenen Mutationen der Sequenz 24 (Abbildung 31B) haben alle Mutationen einen signifikanten Unterschied zur Wildtyp Sequenz 24. Im Vergleich der Induktionsfaktoren von pBT10 mit den Induktionsfaktoren von S24mut2, S24mut4 und S24mut7 kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). In diesen drei Sequenzen ist jeweils die zweite W-Box mutiert.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die W-Boxen, im Besonderen die zweite W-Box mit der Sequenz TTGACC, für eine WRKY41AD vermittelte Reportergenaktivität in pflanzlichen Zellen benötigt werden.

Die WT-Box in Sequenz 24 hat keinen Einfluss auf die WRKY41 vermittelte Reporterexpression in pflanzlichen Zellen.

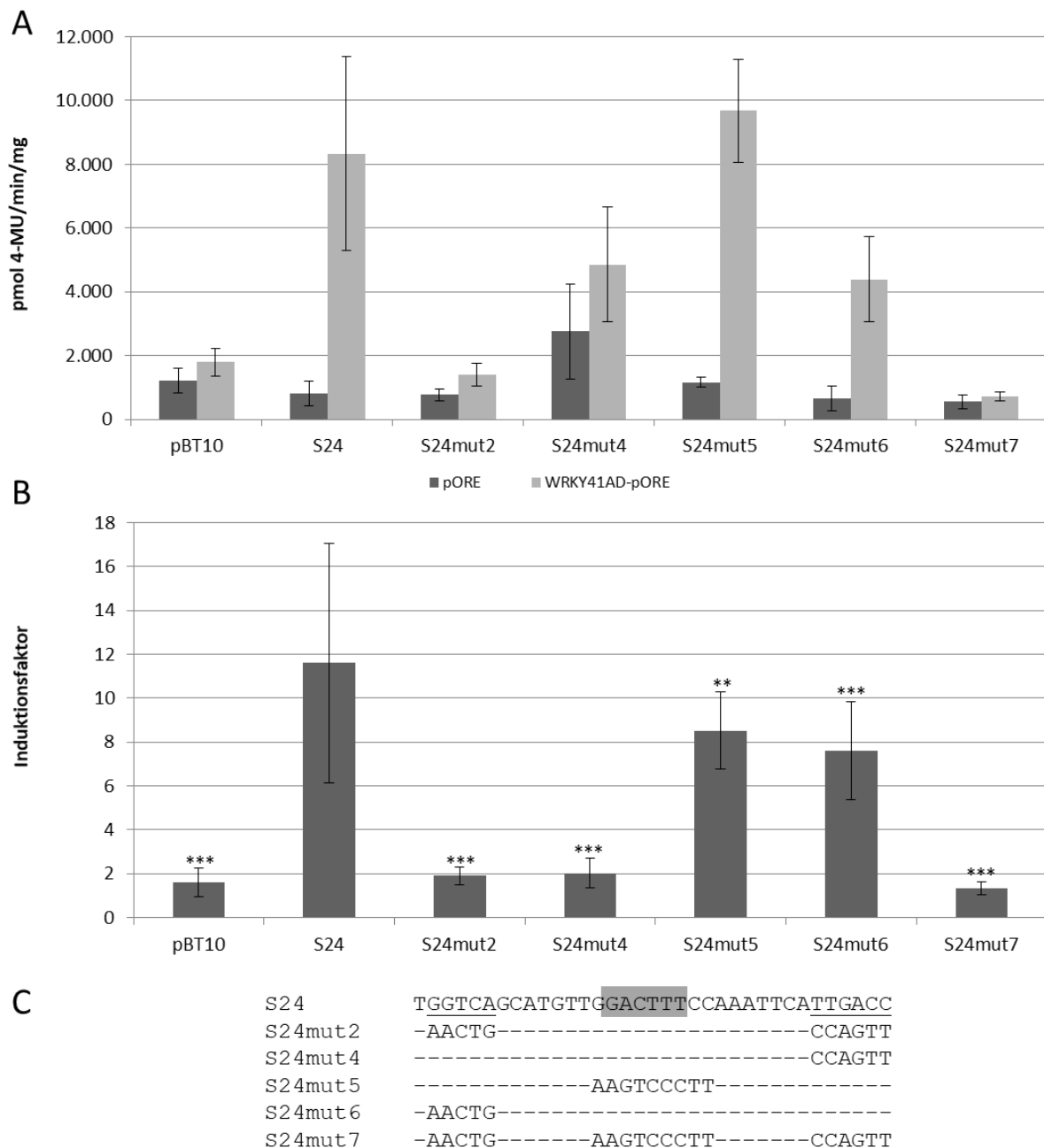


Abbildung 31: WRKY41AD aktiviert die Sequenz 24 vermittelte Reporterexpression

A: Transienter Reporter-Gen-Expression in Petersilienprotoplasten nach Kotretransformation des Sequenz 24 beinhaltenden Reporter-Gen-vektors und dem WRKY41AD exprimierenden Plasmids. Der leere Reporter-Gen-vektor pBT10GUS-d35SLUC (pBT10) dient als negativ Kontrolle der zu testenden Sequenz und der leere Expressionsvektor pORE dient als negativ Kontrolle der Kotretransformation. B: Induktionsfaktoren der WRKY41AD regulierten GUS-Aktivitäten vermittelt durch die unterschiedlichen Mutationen von Sequenz 24. Die Berechnung der statistischen Unterschiede ist jeweils auf den Induktionsfaktor von Sequenz 24 bezogen, bzw. im Vergleich zwischen der Induktion vermittelt durch S24mut2 und S24mut7 (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). C: Sequenz 24 und fünf unterschiedliche Mutanten des cis-Elements. Veränderte Nukleotide der Mutationen werden gezeigt; unveränderte werden nicht gezeigt (-). Die W-Boxen (GGTCA und TTGACC) sind unterstrichen und die WT-Box (GACTTT) ist grau hinterlegt. Die entsprechenden Werte zur Abbildung sind im Anhang in Tabelle 38 und Tabelle 39 aufgeführt.

4.2.3. WRKY26AD reguliert die Sequenz 24 vermittelte Reporter-genaktivität abhängig von den W- und WT-Boxen in Pflanzenzellen

Zur Bestimmung des Einflusses der WT-Box und der W-Boxen aus Sequenz 24 auf die WRKY26 vermittelte Reporter-genaktivität muss der Repressor WRKY26 in einen Aktivator umgewandelt werden. Dies sollte durch eine N-terminale Fusion der Aktivierungsdomäne des GAL4 Transkriptionsfaktors an WRKY26 erfolgen. Dieses Fusionsprotein wird darauf als WRKY26AD bezeichnet.

In Abbildung 32 ist die Regulation der WRKY26AD vermittelten Reporter-genexpression (A) und die entsprechenden Induktionsfaktoren (B) dargestellt (Masterarbeit Ann-Kathrin Bahlmann, 2017).

WRKY26AD aktiviert die Sequenz 24 vermittelte GUS-Aktivität (S24) (Abbildung 32A), somit ist die Umwandlung von WRKY26 in einen Aktivator erfolgreich. Die Mutationen in den beiden W-Boxen (S24mut2), jeweils einer W-Box (S24mut4 und S24mut6), sowie der WT-Box (S24mut5) zeigen eine Verringerung der GUS-Reporter-genaktivität. Eine Dreifachmutante, in der beide W-Boxen und die WT-Box mutiert sind, weist keine WRKY26AD vermittelte Reporter-genaktivität auf (S24mut7). Ist nur die WT-Box in Sequenz 24 vorhanden, kann WRKY26AD die Reporter-genexpression aktivieren (Vergleiche S24mut2 mit S24mut7).

Im Vergleich der Induktionsfaktoren (Abbildung 32B) wird die Beobachtung der Reporter-genexpression (Abbildung 32A) bestätigt. Zum Induktionsfaktor der Wildtyp Sequenz 24 haben alle Mutationen einen signifikanten Unterschied. Im Vergleich der Induktionsfaktoren von pBT10 mit S24mut7 kann kein statistischer Unterschied beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), jedoch im Vergleich zur Doppelmutante in beiden W-Boxen (S24mut2). Dies bedeutet, dass WRKY26 in Abhängigkeit der WT-Box die Genexpression reguliert.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die beiden W-Boxen und die WT-Box in Sequenz 24 einen Einfluss auf die WRKY26 vermittelte Reporter-genexpression in pflanzlichen Zellen haben.

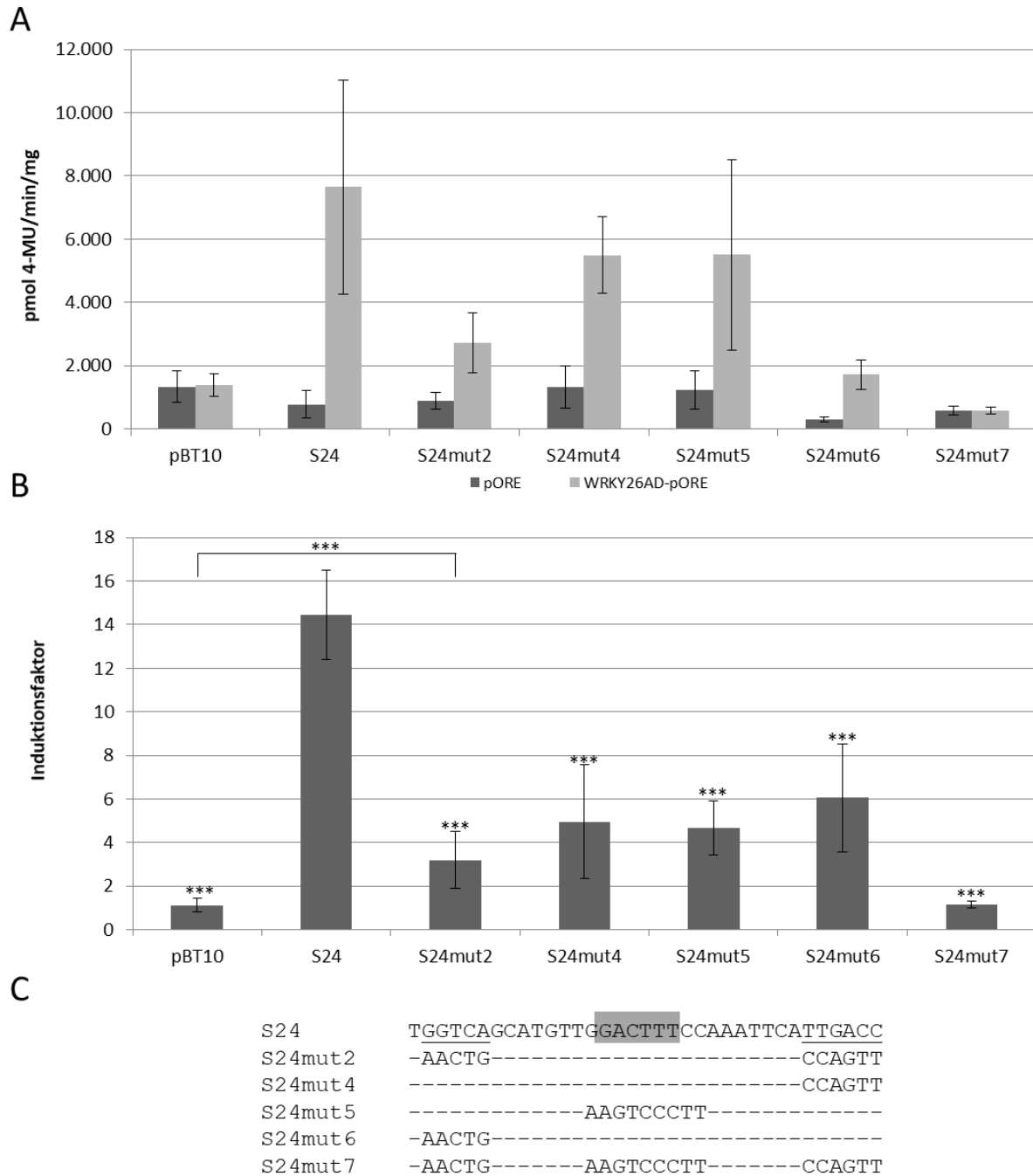


Abbildung 32: WRKY26AD aktiviert die Sequenz 24 vermittelte Reporterogenaktivität

A: Transienter Reportergen-Assay in Petersilienprotoplasten nach Kotransformation des Sequenz 24 beinhaltenden Reporter-genvektors und dem WRKY26AD exprimierenden Plasmids. Der leere Reporter-genvektor pBT10GUS-d35SLUC (pBT10) dient als negativ Kontrolle der zu testenden Sequenz und der leere Expressionsvektor pORE dient als negativ Kontrolle der Kotransformation. B: Induktionsfaktoren der WRKY26AD regulierten GUS-Aktivitäten vermittelt durch die unterschiedlichen Mutationen von Sequenz 24. Die Berechnung der statistischen Unterschiede ist jeweils auf den Induktionsfaktor von Sequenz 24 bezogen, bzw. im Vergleich zwischen der Induktion von S24mut2 und S24mut7 (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). C: Sequenz 24 und fünf unterschiedliche Mutanten des *cis*-Elements. Veränderte Nukleotide der Mutationen werden gezeigt; unveränderte werden nicht gezeigt (-). Die W-Boxen (GGTCA und TTGACC) sind unterstrichen und die WT-Box (GACTTT) ist grau hinterlegt. Die entsprechenden Werte zur Abbildung sind im Anhang in Tabelle 40 und Tabelle 41 aufgeführt.

4.2.4. Die WT- und W-Boxen sind für die direkte Interaktion zwischen WRKY26 und der *cis*-Sequenz 24 notwendig

Im Petersilienprotoplastensystem konnte gezeigt werden, dass die W- und WT-Boxen in der *cis*-Sequenz 24 für eine WRKY26AD vermittelte Reportergenaktivität notwendig sind (4.2.3). Zur Untersuchung einer direkten Interaktion von WRKY26 mit der *cis*-Sequenz 24 wurden EMSA Experimente durchgeführt. Dafür wurde die cDNA von WRKY26 in einen *E. coli* Expressionsvektor kloniert (3.15.31), das Protein überexprimiert und aufgereinigt (3.15.43). Die zu untersuchende *cis*-Sequenz 24 wurde radioaktiv markiert und zusammen mit dem aufgereinigten Protein im EMSA eingesetzt (3.15.45).

Abbildung 33 zeigt die Ergebnisse des EMSAs mit der markierten *cis*-Sequenz 24 und verschiedenen Kompetitor-Sequenzen. Die Spur 1 zeigt das Ergebnis der markierten Sonde (P) ohne Protein. In Spur 2 ist das Ergebnis der markierten Sonde mit aufgereinigtem Proteinextrakt aus *E. coli* dargestellt, welcher kein WRKY26 exprimiert. Neben der freien Sonde kann kein weiteres Signal detektiert werden. Spur 3 zeigt das Ergebnis, wenn WRKY26 zur markierten Sonde hinzugefügt wurde. Es können mehrere Shifts (*) detektiert werden. Diese können durch einen 100-fachen molaren Überschuss an unmarkierter DNA, welche aus der gleichen Sequenz der markierten Sonde besteht, kompetiert werden (Spur 4). In den Spuren 5, 6 und 7 wurden verschiedene Kompetitoren verwendet, sodass bestimmt werden kann, an welche Boxen WRKY26 in Sequenz 24 bindet. Kompetitorsequenzen, in denen beide W-Boxen (Spur 5) oder die WT-Box (Spur 6) mutiert wurden, kompetieren die spezifischen Shifts. Hingegen können die Shifts zwischen WRKY26 und der radioaktiv markierten Sequenz 24 mit der Dreifachmutante S24mut7 (Spur 7) nicht kompetiert werden. Im Anhang unter 8.7 befinden sich zwei unabhängige Wiederholungen des EMSA Experiments mit gleichen Ergebnissen.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass WRKY26 *in vitro* an die W-Boxen und WT-Box in *cis*-Sequenz 24 bindet. Die WT-Box aus Sequenz 24 wird damit von dem tierischen Transkriptionsfaktor NF- κ B p65 und dem pflanzlichen Transkriptionsfaktor WRKY26 für eine direkte Interaktion benötigt (Abbildung 29 und Abbildung 33).

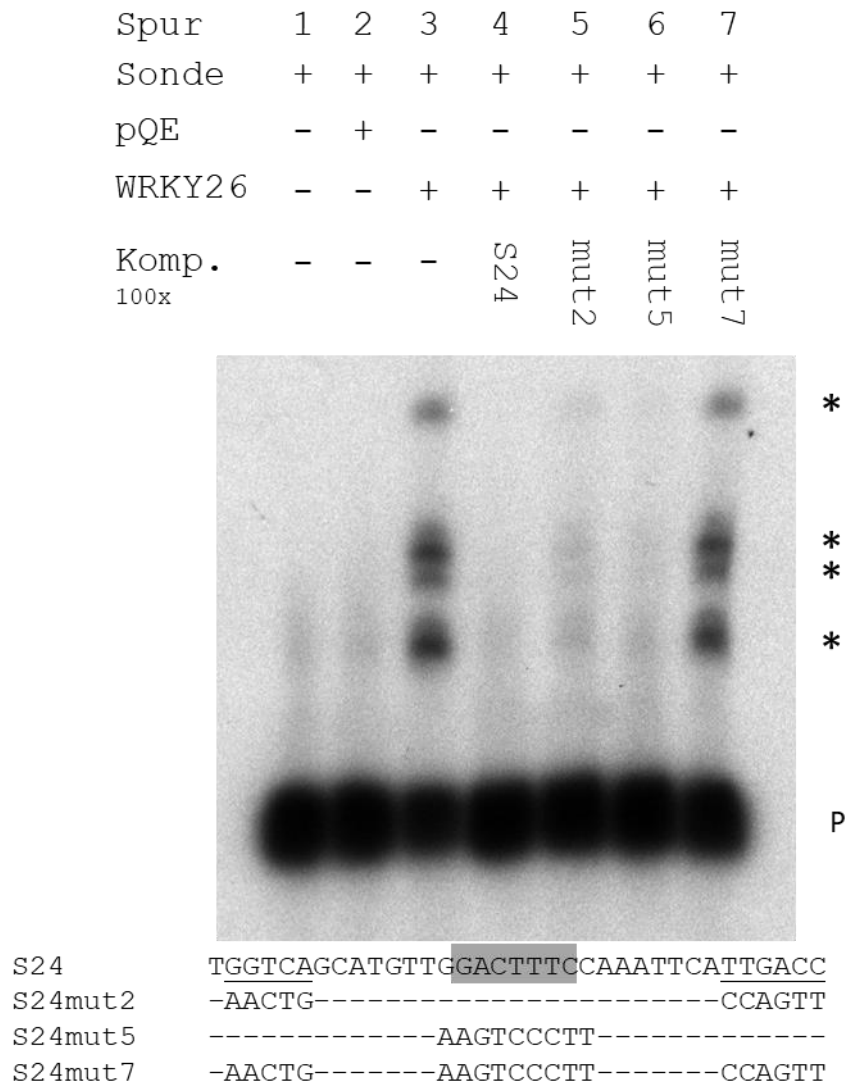


Abbildung 33: WRKY26 bindet *in vitro* abhängig von den W- und WT-Boxen an die Sequenz 24

EMSA mit WRKY26 und der radioaktiv markierten *cis*-Sequenz 24 als Sonde. 1: markierte Sonde. 2: markierte Sonde mit aufgereinigtem Proteinextrakt aus *E. coli*, welcher kein WRKY26 exprimiert. 3: markierte Sonde mit aufgereinigtem WRKY26. 4: markierte Sonde mit aufgereinigtem WRKY26 und Sequenz 24 als unmarkierter Kompetitor in 100x molarem Überschuss. 5: markierte Sonde mit aufgereinigtem WRKY26 und S24mut2 als unmarkierter Kompetitor in 100x molarem Überschuss. 6: markierte Sonde mit aufgereinigtem WRKY26 und S24mut5 als unmarkierter Kompetitor in 100x molarem Überschuss. 7: markierte Sonde mit aufgereinigtem WRKY26 und S24mut7 als unmarkierter Kompetitor in 100x molarem Überschuss. Mit P ist die Position der markierten Sonde markiert. * zeigt die spezifischen DNA-Protein Komplexe an. Die Sequenz 24 und die drei verschiedenen Mutationen der *cis*-Sequenz sind aufgeführt. Veränderte Nukleotide der Mutationen werden gezeigt; unveränderte werden nicht gezeigt (-). Die W-Boxen (GGTCA und TTGACC) sind unterstrichen und die WT-Box (GACTTT) ist grau hinterlegt

4.3. Analyse der MAMP-responsiven *cis*-Sequenz 18

In den vorangegangenen Kapiteln 4.1 und 4.2 konnte gezeigt werden, dass sowohl der tierische Transkriptionsfaktor NF- κ B p65 als auch der pflanzliche Transkriptionsfaktor WRKY26 an die WT-Box aus der *cis*-Sequenz 24 binden. NF- κ B p65 aktiviert die durch die *cis*-Sequenz 18 vermittelte Reportergenaktivität am stärksten (Abbildung 19). Aufgrund dessen ist die Identifizierung eines pflanzlichen Transkriptionsfaktors, der an Sequenz 18 bindet, interessant. Über einen Yeast One-Hybrid Screen soll ein möglicher Interaktionspartner isoliert und anschließend analysiert werden.

4.3.1. WRKY40 interagiert mit Sequenz 18 in Hefezellen

Zur Identifizierung von möglichen Interaktionspartnern der *cis*-Sequenz 18 wurden Yeast One-Hybrid Screens (3.15.39) mit der Mitsuda *et al.* (2010) *A. thaliana* Transkriptionsfaktor *only-library* durchgeführt (Bachelorarbeit Marcel Staar, 2017). Dabei wurden zwei verschiedene Bait-Stämme verwendet. Einmal der *cis*-Sequenz 18 Bait-Stamm und der *cis*-Sequenz S18mut3 Bait-Stamm, dieser trägt eine Punktmutation, sodass das Adenin vor der WT-Box (AGACTTTT) in ein Thymidin (TGACTTTT) verändert wurde. Damit wurde eine WRKY-Bindestelle generiert. Dieser S18mut3 Bait-Stamm soll als mögliche Kontrolle für den Yeast One-Hybrid dienen. Die *HIS3*-Hintergrundexpression der beiden Stämme kann mit einer Konzentration ab 50 mM 3-AT unterdrückt werden (Anhang: Abbildung 38).

In den Yeast One-Hybrids Screens sind verschiedene WRKY und NAC Faktoren als mögliche Interaktionspartner gefunden worden (Anhang: Tabelle 43 und Tabelle 44). Die Prey-Plasmide der Faktoren WRKY11, 40, 61 und 70, sowie einem NAC-Faktor (AT1G19040) und NAC3 wurden in den *cis*-Sequenz 18 Bait-Stamm retransformiert und auf entsprechendem Selektionsmedium ausgebracht. Kein Wachstum der Bait-Stämme mit den Prey-Proteinen WRKY11, 61 und 70, sowie dem NAC Faktor AT1G19040 und NAC3 kann auf dem Selektionsmedium ab einer 3-AT Konzentration von 50 mM beobachtet werden (Anhang: Abbildung 39). Somit sind diese Prey-Proteine keine Interaktionspartner der Sequenz 18.

In Abbildung 34 ist das Wachstum des *cis*-Sequenz 18 Bait-Stammes mit dem Prey-Protein WRKY40 dargestellt. Ein Wachstum dieses Hefestammes und der positiv Kontrolle kann auf allen verschiedenen Selektionsplatten festgestellt werden. Die negativ Kontrolle zeigt kein Wachstum auf den SD-Platten ab einer 3-AT Konzentration von 50 mM.

Dieses Ergebnis zeigt, dass WRKY40 die *cis*-Sequenz 18 vermittelte Reportergenaktivität in Hefezellen reguliert.

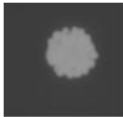

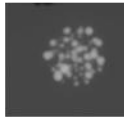
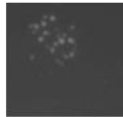








| Bait | Prey | SD -Trp/-Leu | SD-Trp/-Leu/-His + 3-AT | | |
|--------------------|--------|---|---|--|---|
| | | | 0 mM | 50 mM | 100 mM |
| S18 | WRKY40 |  |  |  |  |
| Positiv Kontrolle | |  |  |  |  |
| Negative Kontrolle | |  |  |  |  |

Abbildung 34: Yeast One-Hybrid Analyse der Retransformation von WRKY40 in den *cis*-Sequenz 18 Bait-Stamm

Das Prey-Protein WRKY40 im *cis*-Sequenz 18 Bait-Stamm ermöglicht ein Wachstum der Hefe auf dem Selektionsmedium SD-Trp/-Leu/-His mit einer 3-AT Konzentration über 50 mM.

4.3.2. WRKY40 reprimiert die Sequenz 18 regulierte Reporterogenaktivität

Zur Ermittlung der Regulation von WRKY40 auf die Sequenz 18 vermittelte Genexpression wurde das Petersilienprotoplastensystem verwendet. Kotransformationen des pflanzlichen Expressionsvektors pORE, der WRKY40 exprimiert bzw. nicht exprimiert, wurden zusammen mit den Reportergenplasmiden, die das Tetramer von *cis*-Sequenz 18 enthalten, durchgeführt. In Abbildung 35 ist das Ergebnis des Reportergen-Assays dargestellt.

Die Kotransformationen des Reportergenplasmids pBT10GUS-d35SLUC (pBT10) mit dem leeren bzw. WRKY40 exprimierenden Plasmid pORE zeigen keine Veränderung der Reportergenexpression durch eine Pep25-Behandlung oder durch die Anwesenheit von WRKY40. Die Kotransformation von WRKY40 als Effektor zusammen mit dem Sequenz 18 beinhaltenden pBT10 Plasmid zeigt keine gesteigerte Reportergenaktivität (Vergleiche S18 + pORE - Pep25 mit S18 + WRKY40-pORE - Pep25). In Abwesenheit von WRKY40 induziert Pep25 eine Sequenz 18 vermittelte Reportergenaktivität, hingegen wird die Pep25-Induktion durch Anwesenheit von WRKY40 gesenkt (Vergleiche S18 + pORE + Pep25 mit S18 + WRKY40-pORE + Pep25).

Dies verdeutlicht, dass WRKY40 die MAMP-responsive Sequenz 18 vermittelte Reportergenaktivität reprimiert.

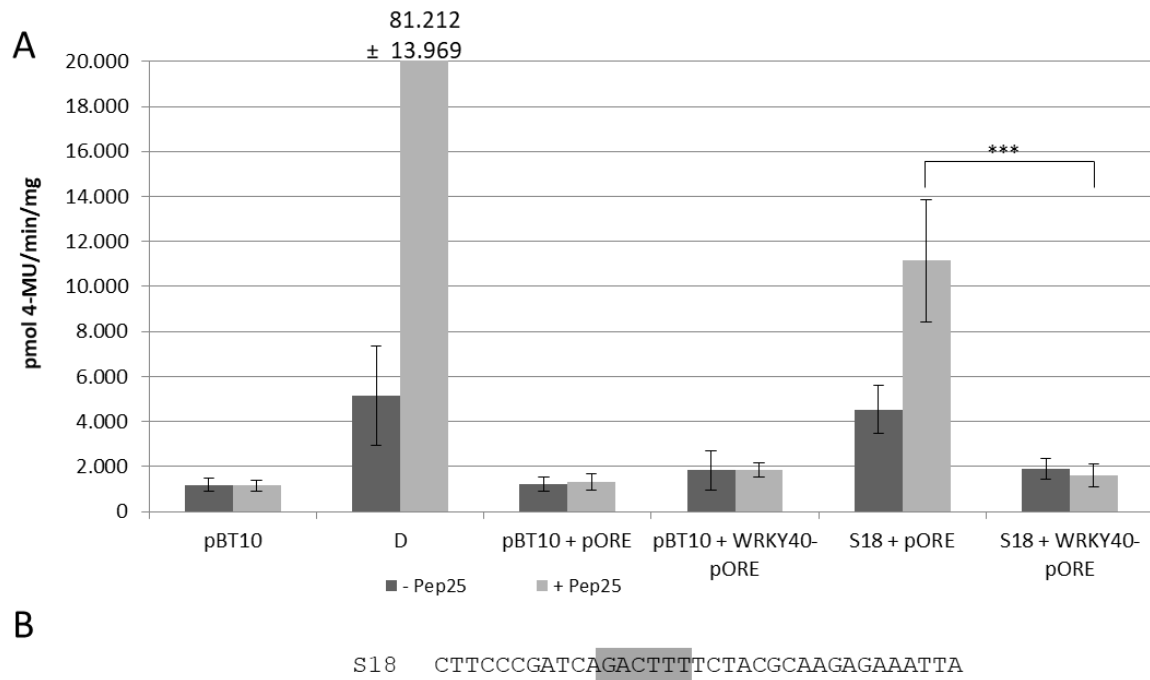


Abbildung 35: Die MAMP-responsive Sequenz 18 vermittelte Reporterogenaktivität wird durch WRKY40 reprimiert

A: Transienter Reporter-gen-Assay in Petersilienprotoplasten nach Kotransformation des Reporter-gen-plasmids mit dem Tetramer der Sequenz 18 und WRKY40 exprimierenden oder nicht exprimierenden Plasmids (pORE) in An- oder Abwesenheit von Pep25. Der leere Reporter-gen-vektor (pBT10) und der D-Element beinhaltende Vektor (D) dienen als negativ und positiv Kontrolle der Pep25-Behandlung. Die Berechnung der statistischen Unterschiede ist jeweils auf die GUS-Aktivität der Kotransformation des WRKY40 exprimierenden bzw. nicht exprimierenden pORE Vektors mit Pep25-Behandlung bezogen (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). B: Nukleotidabfolge von Sequenz 18. Grau hinterlegt ist die WT-Box (GACTTTT). Die entsprechenden Werte zur Abbildung sind im Anhang in der Tabelle 42 aufgeführt.

4.3.3. Identifizierung des WRKY40 responsiven Bereichs in der *cis*-Sequenz 18

WRKY40 reprimiert die MAMP-responsive Sequenz 18 vermittelte Reporter-gen-expression in pflanzlichen Zellen (Abbildung 35). Innerhalb von Sequenz 18 befindet sich neben der WT-Box kein weiteres *cis*-Element. In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass WRKY Faktoren an WT-Boxen innerhalb anderer *cis*-Sequenzen binden können und somit die Genexpression regulieren (Machens *et al.*, 2014; Abbildung 33). Aufgrund dessen könnte die WT-Box AGACTTTT in Sequenz 18 die Bindungsstelle von WRKY40 sein. Zur Verifizierung muss der WRKY40 responsive Bereich innerhalb von Sequenz 18 weiter eingegrenzt werden.

In Hefe könnte eine Eingrenzung der WRKY40 Bindungsstelle unter Verwendung von verschiedenen Bait-Stämmen, die unterschiedliche Mutationen in Sequenz 18 tragen, erfolgen. Aufgrund hoher *HIS3*-Hintergrundexpression der unterschiedlichen Bait-Stämme kann eine Eingrenzung des WRKY40 responsiven Bereichs der Sequenz 18 in Hefezellen nicht vorgenommen werden (Anhang: Abbildung 38).

Eine Ermittlung des WRKY40 regulatorischen Bereichs in pflanzlichen Zellen könnte im Petersilienprotoplastensystem erfolgen. Dafür wurde der Repressor WRKY40 in einen Aktivator durch N-terminale Fusion der Aktivierungsdomäne des GAL4 Transkriptionsfaktors aus Hefe kloniert und Kotransformationsexperimente mit unterschiedlichen Sequenz 18 Reportergenkonstrukten durchgeführt. Die WRKY40 vermittelte Reportergenaktivität war so gering, dass keine Eingrenzung erfolgen konnte (Daten nicht gezeigt).

Weitere Analysen zur Ermittlung des WRKY40 responsiven Bereichs in Sequenz 18 werden benötigt. Möglicherweise könnten über EMSA Experimente mit in *E. coli* exprimiertem und aufgereinigtem WRKY40 und markierter Sequenz 18 als Sonde die Interaktionsstelle von WRKY40 bestimmt werden.

Damit konnte bisher nicht gezeigt werden, ob NF- κ B p65 und WRKY40 die gleiche Bindungsstelle in der *cis*-Sequenz 18 aufweisen.

5. Diskussion

5.1. In einem kombinatorischen Element wird die Typ II WT-Box zu einer WRKY Bindestelle

Die in dieser Arbeit untersuchten *cis*-Sequenzen wurden durch eine Kombination aus bioinformatischen und experimentellen Analysen entdeckt, mit dem Ziel, neue MAMP-responsive Sequenzen in *A. thaliana* Promotoren zu identifizieren (Koschmann *et al.*, 2012). In diesen Studien wurden über Mustererkennungsprogramme und der PathoPlant Datenbank konservierte *cis*-Sequenzen aus Promotoren von Genen, die durch pathogene Stimuli hochreguliert werden, detektiert (Che *et al.*, 2005; Bülow *et al.*, 2007). Diese Sequenzen wurden in 37 Motivgruppen eingeteilt (Koschmann *et al.*, 2012). Über das Web-Tool STAMP und den Datenbanken PLACE, AGRIS und AthaMap wurden Ähnlichkeiten in den bioinformatisch identifizierten Motiven zu bereits bekannten Daten von Transkriptionsfaktorbindestellen aufgezeigt (Higo *et al.*, 1999; Steffens *et al.*, 2004; Palaniswamy *et al.*, 2006). Die Motivgruppe 27 mit der Kernsequenz GACTTT zeigt Ähnlichkeiten zu WRKY Bindestellen (Koschmann *et al.*, 2012). Aufgrund der Thymine und der Ähnlichkeit zur WRKY Bindestelle wird das Motiv als WT-Box bezeichnet (Machens *et al.*, 2014). Abhängig von den Ergebnissen in Yeast One-Hybrid Screens der unterschiedlichen *cis*-Sequenzen aus Motivgruppe 27 mit der Transkriptionsfaktor *only-library* von Mitsuda *et al.* (2010) wird die WT-Box in zwei unterschiedliche Typen unterteilt. Die WT-Box CGACTTTT aus Sequenz 20 selektiert WRKY70 in Yeast One-Hybrid Screens und WRKY70 interagiert auch mit der WT-Box TGACTTTT *in vitro* (Machens *et al.*, 2014). Hingegen wurde kein WRKY Faktor als Interaktionspartner für die WT-Boxen GGACTTTT und GGACTTTG aus Sequenz 15 in Yeast One-Hybrid Screens identifiziert (Lehmeyer *et al.*, 2016). Basierend auf diesen Ergebnissen wird die WT-Box abhängig des Nukleotids vor der Kernsequenz GACTTT in zwei Typen unterteilt. Die Sequenz YGACTTT wird als Typ I WT-Box und WRKY Bindestelle klassifiziert und die Sequenz GGACTTT als Typ II WT-Box. Typ II WT-Box interagierende Proteine wurden im Yeast One-Hybrid Screen nicht identifiziert (Tabelle 1 in 1.3). Die Typ II WT-Box kommt in den *cis*-Sequenzen 15 (GGACTTTT und GGACTTTG) und 24 (GGACTTTC) vor. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass WRKY26 mit der Typ II WT-Box GGACTTTC aus Sequenz 24 interagiert (Abbildung 33). Dementsprechend handelt es sich bei der WT-Box wahrscheinlich um eine generelle WRKY Bindestelle. Für die Typ II WT-Box GGACTTTTC (LS10) aus dem *PR1* Promotor konnte WRKY50 über *protoplast transactivation assays* als regulierender Faktor identifiziert werden (Hussain *et al.*, 2018). Eine direkte Interaktion von WRKY50 mit der Typ II WT-Box wurde durch Mutationen in der DNA-Sequenz zerstört (Hussain *et al.*, 2018). Eine Einteilung in die verschiedenen Typen der WT-Boxen abhängig von einer

Interaktion mit WRKY Faktoren kann somit nicht mehr erfolgen. Des Weiteren trägt die *cis*-Sequenz 18 ein Adenin vor der WT-Box Kernsequenz (AGACTTTT). Bisher wurde keine Einteilung in eine Typ I oder II WT-Box vorgenommen. Über Yeast One-Hybrid Screens wurde WRKY40 als Interaktionspartner identifiziert (Abbildung 34) und in pflanzlichen Zellen reprimiert WRKY40 die durch Sequenz 18 vermittelte MAMP-Responsivität (Abbildung 35). Innerhalb von Sequenz 18 befindet sich keine klassische W-Box (Abbildung 7). Aufgrund der Ergebnisse der Interaktion von WRKY70 mit Typ I WT-Boxen (Machens *et al.*, 2014) und WRKY26 mit der WT-Box aus Sequenz 24 (Abbildung 33) liegt die Hypothese nahe, dass WRKY40 mit der WT-Box aus Sequenz 18 interagieren könnte. Zhou *et al.* (2018) identifizierten die WT-Box ähnliche Sequenz AGACTTTT aus dem Gen *SARD1* (AT1G73805) als WRKY70 Bindestelle *in vitro*. Aufgrund dessen könnte es sich ebenfalls bei der Sequenz AGACTTTT aus dem *cis*-Element 18 um eine WRKY Bindestelle handeln. Weitere Analysen zur Eingrenzung der WRKY40 Bindestelle innerhalb der Sequenz 18 sind nötig, um diese WT-Box (AGACTTTT) als mögliche WRKY Bindestelle zu identifizieren. Aufgrund dessen handelt es sich bei den verschiedenen WT-Boxen um WRKY Faktor Bindestellen.

Interessanterweise kommen die Typ II WT-Boxen in den Sequenzen 15 (GGACTTTT und GGACTTTG) und 24 (GGACTTTC) in Kombination mit weiteren *cis*-Elementen vor. Sequenz 15 enthält neben den beiden WT-Boxen eine GCC-Box, an die ORA59 und ERF10 binden. Alle drei *cis*-Elemente werden für eine volle MAMP-Responsivität des synthetischen Promotors benötigt (Lehmeyer *et al.*, 2016). Die Sequenz 24 enthält neben der WT-Box zwei W-Boxen. Eine Mutation in der ersten W-Box und in der WT-Box reduziert oder eliminiert die MAMP-Responsivität, hingegen hat die zweite W-Box keinen Einfluss auf die Reporterexpression (Kanofsky *et al.*, 2017). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Typ II WT-Boxen aus Sequenz 15 und 24 Teil eines kombinatorischen Elementes sind, welches ein weiteres *cis*-Element für eine MAMP-Responsivität benötigen. Ein ähnliches Ergebnis wird mit der Sequenz AGGACTTTTC, die eine Typ II WT-Box enthält, aus dem *PR1* Promotor beobachtet. Promotordeletionen und *linker scanning* Experimente zeigen, dass diese Typ II WT-Box notwendig, aber nicht ausreichend für eine 2,6-Dichloroisonicotinsäure (INA) Induktion ist (Lebel *et al.*, 1998). In diesem Promotor benötigt die WT-Box möglicherweise für die INA-Responsivität eine bZIP Bindestelle (LS7; Lebel *et al.*, 1998). Der an dieser WT-Box bindende WRKY50 interagiert mit den bZIP Transkriptionsfaktoren TGA2 und TGA5 für eine mögliche kooperative *PR1* Expression (Hussain *et al.*, 2018). Die Sequenz 18 mit der WT-Box AGACTTTT vermittelt bei Koschmann *et al.* (2012) und in der vorgelegten Arbeit nur eine geringe Pep25-Responsivität (Abbildung 21). Durch Analyse von verschiedenen Mutationen in der *cis*-Sequenz konnte gezeigt werden, dass die WT-Box für die MAMP-Responsivität notwendig ist. Interessant ist die Beobachtung, dass eine Mutation, die zusätzlich zur WT-Box eine potentielle GCC-Box generiert (S18mut8), die Pep25-vermittelte Reporterexpression verstärkt (Abbildung 21). In Analysen von Sequenzen, in denen die WT-Box mutiert ist und die GCC-Box vorhanden ist, konnte keine

Pep25-Induktion gemessen werden (Abbildung 36 und Abbildung 37 im Anhang unter 8.1). Dieses Ergebnis zeigt, dass die WT- und GCC-Box in Sequenz 18 (Mutation S18mut8) kombinatorisch die Expression regulieren. Die Kombination aus WT- und GCC-Box ist ebenfalls in Sequenz 15 vorhanden (Lehmeyer *et al.*, 2016). Die *cis*-Sequenzen 21 und 22 weisen neben den Typ I WT-Boxen jeweils zwei W-Boxen auf, wobei diese mit der WT-Box überlappen und deshalb der Pep25-responsive Bereich nicht auf einzelne Boxen eingegrenzt werden kann (Koschmann *et al.*, 2012; Kanofsky *et al.*, 2017). Interagierende Transkriptionsfaktoren, die an kombinatorische Elemente binden, könnten eine höhere Variation in ihrer Bindespezifität aufweisen, wenn einer der interagierenden Faktoren an eine hoch konservierte Bindestelle des kombinatorischen Elements bindet (Hehl, 2017). Dieses Phänomen wird auch als latente Spezifität bezeichnet (Lelli *et al.*, 2012). Diese Fälle sind in Säugetieren bekannt (Hai und Curran, 1991; Kel *et al.*, 1999). Die Notwendigkeit eines Interaktionspartners könnte erklären, warum kein Transkriptionsfaktor für die Typ II WT-Boxen GGACTTTT und GGACTTTG in einem Yeast One-Hybrid Screen gefunden wurde (Lehmeyer *et al.*, 2016). Dies führt zu der Frage, wie bindende Transkriptionsfaktoren für diese WT-Boxen identifiziert werden können. In den letzten Jahren wurde die Spezifität der DNA-Bindestellen von ca. 1000 *A. thaliana* Transkriptionsfaktoren analysiert (Franco-Zorrilla *et al.*, 2014; Weirauch *et al.*, 2014; O'Malley *et al.*, 2016; Hehl, 2017). Manche dieser Daten können online zur Vorhersage von Transkriptionsfaktoren für spezifische DNA-Sequenzen verwendet werden (Weirauch *et al.*, 2014). Bisher fehlen Daten zur DNA-Bindesspezifität von Transkriptionsfaktoren an kombinatorischen Elementen. Transkriptionsfaktoren, die eine latente Spezifität zu einem kombinatorischen Element aufweisen, können mit den online Daten bisher nicht postuliert werden. Über einen genetischen Ansatz könnten die Transkriptionsfaktoren und entsprechende kombinatorische Elemente identifiziert werden. Die Expression des Gens, das das kombinatorische Element im Promoter enthält, kann nur in Anwesenheit aller interagierender Faktoren exprimiert werden. Über Vergleiche von Microarray und Expressionsanalysen in Expressions- bzw. *knock out* Linien von potentiellen Transkriptionsfaktoren des kombinatorischen Elements könnte die kooperative bzw. latente Regulation des Zielgens durch entsprechende Transkriptionsfaktoren bestätigt werden.

Neben den von Koschmann *et al.* (2012) identifizierten WT-Box beinhaltenden Sequenzen wurden weitere *cis*-Elemente entdeckt, die die GACTTT Kernsequenz enthalten. Die reverse komplementäre Sequenz AAAAGTC ist in Promotoren von Genen angereichert, die responsiv auf flg22 und *Phytophthora infestans* reagieren (Zou *et al.*, 2011). Die GACTTT Kernsequenz ist außerdem in Promotoren von Genen aus Pflanzen identifiziert worden, die durch Methylviologen induziert werden (Scarpeci *et al.*, 2008). Liu *et al.* (2015) konnten zeigen, dass die *in vivo* WRKY33 Bindestelle mit einer *cis*-Sequenz verbunden ist, die die GACTTT Sequenz enthält. WRKY33 aktiviert die Abwehr bei einer *Botrytis cinerea* Infektion (Birkenbihl *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2006). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass

ein Tetramer der WT-Box CGACTTT eine Reporterexpression nach *Botrytis cinerea* Infektion vermittelt (Bolivar *et al.*, 2014).

Zusammenfassend lässt sich damit sagen, dass die MAMP-responsiven WT-Boxen WRKY Bindestellen sind. Durch Interaktion von WRKY Faktoren an Typ I WT-Boxen wird direkt die Genexpression reguliert, hingegen regulieren Typ II WT-Boxen die Transkription in Kombination mit weiteren *cis*-Elementen.

5.2. Der Einfluss von WRKY26, 40, 41 und 70 auf die *cis*-Sequenz 24 vermittelte Expression

Durch einen Yeast One-Hybrid Screen wurden verschiedene Transkriptionsfaktoren als Interaktionspartner der *cis*-Sequenz 24 identifiziert (Kanofsky *et al.*, 2017). Sequenz 24 enthält die klassische W-Box mit der Sequenz TTGACC/T (Abbildung 7). Die W-Box wurde in den Promotoren von *PR1-1* und *PR1-2* in Petersilie identifiziert (Rushton *et al.*, 1996). Diese Promotoren enthalten die Sequenzen TTGACC in den W1- und W2-Boxen, welche durch Mutationen ihre Funktion verlieren. Die W3-Box enthält die Kernsequenz TGAC, welche für die Promotorfunktion notwendig ist (Eulgem *et al.*, 1999; Rushton *et al.*, 1996). Unter Verwendung der W-Box wurde der erste WRKY Faktor mit einer Petersilien Expressions Library isoliert (Rushton *et al.*, 1996). Für die meisten WRKY Faktoren ist die W-Box TTGACC/T die minimale Konsensussequenz, die für eine spezifische DNA-Bindung notwendig ist (Rushton *et al.*, 2010). Die Interaktion von spezifischen WRKY Faktoren mit der W-Box ist abhängig von den benachbarten Nukleotiden dieser Sequenz (Ciolkowski *et al.*, 2008). Von den verschiedenen WRKY Faktoren, die mit Sequenz 24 selektiert wurden, wurde die WRKY26, 40, 41 und 70 vermittelte Reporterexpression in Hefe bestätigt (Kanofsky *et al.*, 2017). Weitere Experimente in Hefe mit einer Doppelmutterante in beiden W-Boxen der Sequenz 24 zeigten die Wichtigkeit der W-Boxen für diese Reporterexpression.

In pflanzlichen Zellen wurde die spezifische Funktion der verschiedenen WRKY Faktoren durch Koexpression dieser mit den Sequenz 24 Reporterkonstrukten analysiert. Dabei wurden die nativen WRKY Faktoren ohne die N-terminal fusionierte GAL4 Aktivierungsdomäne, welche in der Transkriptionsfaktor *only-library* verwendet wird, genutzt. In Pflanzenzellen aktiviert WRKY70 die Sequenz 24 vermittelte Reporterexpression (Kanofsky *et al.*, 2017), wohingegen WRKY26, 40 und 41 die MAMP-responsive Genexpression reprimieren (Abbildung 30). Die WRKY Transkriptionsfaktorfamilie wird abhängig von ihrer Anzahl an WRKY Domänen und Art des Zinkfinger Motivs in drei Gruppen unterteilt (Eulgem *et al.*, 2000). WRKY70 ist Mitglied der Gruppe III der WRKY Transkriptionsfaktoren (Kalde *et al.*, 2003). WRKY Faktoren dieser Gruppe haben eine WRKY Domäne und einen Zinkfinger mit einem C2-HC Motiv, welches bei den anderen beiden Gruppen ein C2-H2

Motiv ist (Eulgem *et al.*, 2000). WRKY70 spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der antagonistischen Salicylsäure und Jasmonsäure Signalwege, da die WRKY70 Expression durch Salicylsäure aktiviert und durch Jasmonsäure reprimiert wird (Li *et al.*, 2004). WRKY70 Überexpressionslinien und *wrky70* Mutanten zeigen ebenfalls einen gegenteiligen Effekt auf die Jasmonsäure vermittelte Resistenz gegenüber *Alternaria brassicicola* und der Salicylsäure vermittelten Resistenz gegen *Erysiphe cichoracearum* (Li *et al.*, 2006). Die cis-Sequenz 24 ist Teil des WRKY30 Promotors (Kanofsky *et al.*, 2017). Auch wenn WRKY30 nicht unter den Genen war, die durch eine Überexpression oder Reprimierung von WRKY70 in transgenen *A. thaliana* Pflanzen beeinflusst wurden (Li *et al.*, 2004), zeigen verschiedene Untersuchungen, dass WRKY70 die WRKY30 Expression reguliert (Besseau *et al.*, 2012; Machens *et al.*, 2014; Kanofsky *et al.*, 2017). In Petersilienprotoplasten konnte gezeigt werden, dass WRKY70 die Reporterexpression abhängig von den W-Boxen aus Sequenz 24 aktiviert (Kanofsky *et al.*, 2017).

WRKY41 ist ebenfalls Mitglied der Gruppe III von WRKY Faktoren. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der native WRKY41 die MAMP-responsive Sequenz 24 vermittelte Reporterexpression reprimiert (Abbildung 30). In Hefezellen benötigt WRKY41 eine Kombination aus den W- und WT-Boxen zur Reporterexpression (Kanofsky *et al.*, 2017). Der in einen Aktivator umgewandelte Faktor WRKY41AD vermittelt die Reporterexpression abhängig von den W-Boxen aus Sequenz 24 in Pflanzenzellen (Abbildung 31). Die WT-Box in Sequenz 24 wird für eine WRKY41AD vermittelte Reporterexpression in pflanzlichen Zellen nicht benötigt. In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass WRKY41 sowohl als Aktivator agiert, als auch die Methyljasmonat induzierte *PDF1.2* Expression reprimieren kann (Ding *et al.*, 2014; Higashi *et al.*, 2008). Ein nahe verwandter WRKY Faktor mit ebenfalls einer dualen Funktion als Aktivator und Repressor ist WRKY53 (Kalde *et al.*, 2003; Miao *et al.*, 2004). Deshalb scheint die duale Funktion in WRKY41 konserviert zu sein.

WRKY40 ist Mitglied der Gruppe II von WRKY Faktoren, die nur eine WRKY Domäne beinhalten (Eulgem *et al.*, 2000). In Arbeiten aus anderen Laboren konnte bereits gezeigt werden, dass WRKY40 die Genexpression reprimiert (Shang *et al.*, 2010; Pandey *et al.*, 2010; Van Aken *et al.*, 2013). WRKY40 wird bei Infektion von avirulenten und virulenten *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000, sowie durch *Botrytis cinerea* und Salicylsäure hochreguliert (Dong *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2006). Die von WRKY40 reprimierte MAMP-responsive Sequenz 24 vermittelte Reporterexpression (Abbildung 30), ist abhängig von den W-Boxen in Hefe (Kanofsky *et al.*, 2017). Die WT-Box wird in Hefe zur Regulation der Reporterexpression nicht benötigt. Die Bindung von WRKY40 an Zielgene wurde durch Protein-Bindungs-Microarrays untersucht. Die dabei identifizierte Konsensus-Bindesequenz NWTGACYN (Weirauch *et al.*, 2014) ist in der zweiten W-Box aus Sequenz 24 enthalten (Abbildung 7).

WRKY26 ist Mitglied der Gruppe I von WRKY Faktoren, diese haben jeweils zwei WRKY Domänen (Eulgem *et al.*, 2000). WRKY26 wird bei einer Infektion mit einem avirulenten *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 Stamm hochreguliert, jedoch nicht durch Salicylsäure (Dong *et al.*, 2003). Des Weiteren spielt WRKY26 eine positive Rolle in der Thermotoleranz (Li *et al.*, 2011). Die Funktion von WRKY26 als Aktivator oder Repressor wurde bisher nicht gezeigt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass WRKY26 die MAMP-responsive Sequenz 24 vermittelte Genexpression in Pflanzenzellen reprimiert (Abbildung 30). In Hefe werden sowohl die W-Boxen als auch die WT-Box für die Regulation der Reportergenaktivität benötigt (Kanofsky *et al.*, 2017). Zur Bestimmung des Einflusses der W- und WT-Boxen auf die WRKY26 regulierte Genexpression in pflanzlichen Zellen wurde WRKY26 in einen Aktivator umgewandelt. WRKY26AD reguliert die Sequenz 24 vermittelte Reportergenaktivität in Abhängigkeit von allen Boxen (Abbildung 32). Zur Untersuchung einer direkten Interaktion von WRKY26 mit der Sequenz 24 wurden EMSAs durchgeführt. WRKY26 interagiert direkt mit Sequenz 24 *in vitro* und durch Konkurrenzexperimente konnte gezeigt werden, dass die W- und WT-Boxen für eine Interaktion notwendig sind (Abbildung 33). Ciolkowski *et al.* (2008) konnten ebenfalls in EMSA Experimenten zeigen, dass WRKY26 an die Sequenzen TTGACC und CTGACC aber nicht an die W-Box Variante TTGACT bindet. Dies stimmt mit den hier präsentierten Ergebnissen überein, da die beiden von Ciolkowski *et al.* (2008) analysierten WRKY26 bindenden W-Box Sequenzen in der *cis*-Sequenz 24 vorhanden sind und für eine WRKY26 regulierte Reportergenexpression (Abbildung 32) und Interaktion (Abbildung 33) benötigt werden. Eine Interaktion von WRKY26 mit der WT-Box GGACTTTC wurde von Ciolkowski *et al.* (2008) nicht analysiert.

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann die Regulation der *WRKY30* Expression erklärt werden. WRKY30 ist beteiligt in der Blatt-Seneszenz (Besseau *et al.*, 2012), sowie bei oxidativem und Salz-Stress während der Keimung (Scarpeci *et al.*, 2013). Des Weiteren vermittelt die *cis*-Sequenz 24 aus dem Promotor von *WRKY30* eine Elicitor-Responsivität in *Petersilie* (Koschmann *et al.*, 2012) und *A. thaliana* (Abbildung 26). Im nicht induzierten Zustand binden die Transkriptionsfaktoren WRKY40 und 41 an die W-Boxen, wohingegen WRKY26 an die W- und WT-Boxen aus Sequenz 24 bindet und dabei die Genexpression reprimieren. Zur Aktivierung der Genexpression von *WRKY30* bindet WRKY70 an die W-Boxen aus Sequenz 24. Neben Sequenz 24 befindet sich im Promotor von *WRKY30* die Sequenz 22 mit der WT-Box TGACTTTT (Koschmann *et al.*, 2012) und WRKY70 vermittelt über diese ebenfalls eine Reportergenaktivität (Machens *et al.*, 2014). Interessanterweise konnte in Yeast Two-Hybrid Experimenten gezeigt werden, dass WRKY70 mit WRKY30 interagiert und beide während der Seneszenz hochreguliert werden (Besseau *et al.*, 2012). Verschiedene WRKY Faktoren können Homodimere bilden oder mit anderen WRKY Faktoren interagieren. WRKY40 beispielsweise kann ein Homo- oder mit WRKY18 ein Heterodimer bilden (Xu *et al.*, 2006). Es wird angenommen, dass WRKY-Dimere an benachbarte W-Boxen binden und die Expression der Zielgene kooperativ oder

antagonistisch regulieren (Chi *et al.*, 2013). Dieses Modell passt in die Struktur von Sequenz 24 mit zwei benachbarten W-Boxen. Über WRKY26 und 41 ist bisher nicht bekannt, ob diese mit anderen WRKY Faktoren interagieren können. WRKY26 kann als einziger WRKY Faktor bisher an die W-Boxen und WT-Box aus Sequenz 24 binden (Abbildung 33). Für eine volle Reportergenaktivität werden in Petersilienprotoplasten alle drei Boxen benötigt. Es scheint ebenfalls, dass die WT-Box einen geringeren Einfluss auf die Reportergenexpression im Vergleich zu den W-Boxen hat (Abbildung 32). Daraus kann geschlossen werden, dass die Bindung von WRKY26 an die W-Boxen und WT-Box kooperativ verstärkt wird. Eine kooperative DNA-Bindung bezeichnet eine Bindungsaffinität von zwei oder mehr Faktoren, die stärker ist als die Summe der einzelnen DNA-Affinitäten (Lelli *et al.*, 2012).

5.3. Der murine NF- κ B p65 interagiert mit MAMP-responsiven *cis*-Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana*

Um weitere Informationen zu möglichen Typ II WT-Box interagierenden Faktoren zu erhalten, wurden die Sequenzen GGACTTTC, GGACTTTT und GGACTTTG an die footprintDB Datenbank (Sebastian und Contreras-Moreira, 2014) ohne Einschränkung auf pflanzliche Transkriptionsfaktoren übermittelt. Diese Analyse postulierte den murinen Transkriptionsfaktor NF- κ B p65 als Interaktionspartner dieser Sequenzen (Tabelle 10 unter 4.1). Aufgrund der wichtigen Rolle von NF- κ B p65 in der angeborenen Immunität von Tieren und dass es sich bei der WT-Box um eine MAMP-responsive *cis*-Sequenz in Pflanzen handelt, wurde der Einfluss des murinen NF- κ B p65 in pflanzlichen Zellen untersucht. In den ersten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der native NF- κ B p65 die Reportergenaktivität in Petersilienprotoplasten reguliert. Zusätzliche Zellkernlokalisierungssignale und Aktivierungsdomänen verstärken diese Reportergenexpression (Abbildung 18). Interessanterweise reguliert NF- κ B p65 die Reportergenaktivität vermittelt durch *cis*-Sequenzen 15 und 24, die Typ II WT-Boxen beinhalten, sowie Sequenz 18, während die GUS-Aktivität der Sequenzen 20, 21, 22 und 23 nicht durch NF- κ B p65 aktiviert wird (Abbildung 19). Diese Ergebnisse decken sich mit den bioinformatischen Analysen der Sequenzen 15, 18 und 24 mit der footprintDB Datenbank (Tabelle 10). Neben den Typ II WT-Box enthaltenden Sequenzen 15 und 24 wurde ebenfalls für Sequenz 18 NF- κ B p65 als möglicher Interaktionspartner der WT-Box postuliert. Diese ist jedoch mit einem e-value von 1,3e-05 und einer Motivähnlichkeit von 5,99 / 8 am geringsten im Vergleich zu den Typ II WT-Boxen (Tabelle 10). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die WT-Boxen AGACTTTT aus Sequenz 18, GGACTTTC und GGACTTTG aus Sequenz 15 und GGACTTTC aus Sequenz 24 zur Aktivierung der Genexpression durch NF- κ B p65 notwendig sind (Abbildung 20, Abbildung 22 und Abbildung 23). In Sequenz 18 sind neben der WT-Box zwei weitere Bereiche für die NF- κ B p65 Regulation verantwortlich (Abbildung 22). Dies könnte erklären, warum die NF- κ B p65 vermittelte Reportergenaktivität am stärksten ist

(Abbildung 19). Die von Lebel *et al.* (1998) als NF- κ B Bindestelle postulierte WT-Box ähnliche Sequenz LS10 (GGACTTTTC) aus dem *PR1* Promotor konnte im Petersilienprotoplastensystem als NF- κ B p65 interagierende Sequenz bestätigt werden (Abbildung 25). Eine direkte Interaktion von NF- κ B p65 mit den WT-Box beinhaltenden Sequenzen 15, 24 und dem Promotorfragment 650 - 600 bp upstream des ATG von *PR1* konnte ebenfalls *in vitro* nachgewiesen werden (Abbildung 28). Die WT-Box wird für diese direkte Interaktion benötigt.

Der am häufigsten vorkommende NF- κ B Komplex ist das Heterodimer aus p50 und p65 (Ueberla *et al.*, 1993). Die Bindestelle mit der Sequenz GGACTTCC wurde im Promotor vom Gen der leichten Kette des Immunglobulins in der Maus entdeckt und als κ B-Motiv bezeichnet (Sen *et al.*, 1986). Wobei die p50 Einheit des NF- κ B Dimers die 5'-site und p65 die 3'-site des κ B-Motives erkennt (Urban *et al.*, 1990; Urban *et al.*, 1991). In Analysen zur Bindungsspezifität verschiedener NF- κ B Homodimere wurde die Sequenz GGGRNTTTC als Bindungssequenz für das Homodimer von NF- κ B p65 identifiziert (Kunsch *et al.*, 1992). Das κ B-Motiv und die NF- κ B p65 Konsensussequenz sind sehr ähnlich zu den Typ II WT-Boxen. In Sequenz 18 sind neben der WT-Box zwei weitere Bereiche (CTTCCC und GAAATTA) für die NF- κ B p65 vermittelte Reportergenaktivität verantwortlich (Abbildung 22). Die Sequenz CTTCCC ist ähnlich zu der 3'-site des κ B-Motives und der NF- κ B p65 Konsensussequenz GGGRNTTTC des Homodimers (Kunsch *et al.*, 1992). Die Sequenz GAAATTA aus Sequenz 18 wiederum ist ähnlich zur Sequenz GGAAATTCC, die ebenfalls als Bindestelle für NF- κ B p65 identifiziert wurde (Chen *et al.*, 1998).

Die von Kunsch *et al.* (1992) identifizierten NF- κ B p65 Bindestellen und die in dieser Arbeit identifizierten NF- κ B p65 regulierten Typ II WT-Boxen kommen in über 1000 Promotoren 500 bp upstream des ATGs vor (Wu-Blast2 bei Arabidopsis.org; Daten nicht gezeigt). Damit könnte NF- κ B p65 einen großen Einfluss auf die Genexpression in *A. thaliana* Pflanzen haben. Das könnte erklären, warum bisher keine funktionelle NF- κ B p65 transgene Linie erhalten wurde (Daten nicht gezeigt). Eine konstitutive NF- κ B p65 Expression könnte in transgenen *A. thaliana* einen letalen Phänotyp aufweisen.

Allgemein konnte gezeigt werden, dass der murine Transkriptionsfaktor NF- κ B p65 die Genexpression in pflanzlichen Zellen über die MAMP-responsiven Typ II WT-Boxen regulieren kann. Die WT-Box wird für eine direkte Interaktion mit NF- κ B p65 benötigt.

5.4. Gibt es strukturelle Ähnlichkeiten zwischen WRKY und NF- κ B und deren induzierten Signalwegen?

Die Ähnlichkeit der murinen NF- κ B p65 Bindestelle und der MAMP-responsiven WT-Box aus *A. thaliana* ist faszinierend. Die WT-Box ist in Petersilienzellen für eine Pep25-induzierte (Machens *et al.*, 2014;

Lehmeyer *et al.*, 2016; Kanofsky *et al.*, 2017) und in *A. thaliana* Protoplasten für eine flg22-vermittelte Reporter-genaktivität verantwortlich (Abbildung 26). In tierischen Zellen wird die NF- κ B vermittelte Genexpression durch verschiedene Elicitoren, wie LPS, Lipoproteine, bakterielle CpG DNA und virale RNA, induziert (Hayashi *et al.*, 2001; Kawai und Akira, 2007). Damit handelt es sich bei der NF- κ B p65 Bindestelle und der WT-Box um eine konservierte MAMP-responsive *cis*-Sequenz in Pflanzen und Tieren. In Tabelle 11 sind die bisherigen Daten der WT-Box interagierenden Transkriptionsfaktoren zusammengefasst.

Tabelle 11: Zusammenstellung der pflanzlichen WRKY (*A. thaliana*) und tierischen NF- κ B p65 (*M. musculus*) Bindestellen

| Interagierende TF aus <i>M. musculus</i> | MAMP-responsive W- und WT-Boxen aus <i>A. thaliana</i> | Interagierende TF aus <i>A. thaliana</i> | Quelle |
|---|--|---|--|
| | TTGACC | WRKY | Rushton <i>et al.</i> , 2010 |
| | TGACTTTT | WRKY70 | Machens <i>et al.</i> , 2014 |
| | CGACTTTT | WRKY70 | Machens <i>et al.</i> , 2014 |
| NF- κ B p65 | AGACTTTT | WRKY70 | Abbildung 22; Zhou <i>et al.</i> , 2018 |
| NF- κ B p65 | GGACTTTC | WRKY26 | Abbildung 29; Abbildung 33 |
| NF- κ B p65 | GGACTTTT | | Abbildung 29 |
| NF- κ B p65 | GGACTTTTC | WRKY50 | Abbildung 29 Hussain <i>et al.</i> , 2018 |

Die Interaktion von WRKY26 und NF- κ B p65 mit der gleichen *cis*-Sequenz verdeutlicht eine Ähnlichkeit der *cis*-Sequenzen zwischen Tieren und Pflanzen. Ein bekanntes Beispiel für eine solche zwischenartliche Verwandtschaft ist wahrscheinlich die bakterielle Pribnow und eukaryotische TATA Box (Burton *et al.*, 2016). Das eukaryotische TATA-Box Binde-Protein (TBP) und der bakterielle Sigmafaktor haben das Helix-Turn-Helix Motiv in ihrer Struktur gemeinsam. Dieses soll im ursprünglichen Initiationsfaktor des letzten universellen gemeinsameren Vorfahren (LUCA), aus welchem sich TBP und der Sigmafaktor entwickelt haben, vorkommen (Burton *et al.*, 2016). Nach diesem Beispiel und aufgrund der Ähnlichkeit der Bindestelle von WRKY26 und NF- κ B p65 könnten beide Transkriptionsfaktorfamilien einen gemeinsamen Ursprung und strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen. Von WRKY4 aus *A. thaliana* wurde die Struktur der C-terminalen Domäne analysiert. Diese besteht aus einem viersträngigem β -Faltblatt mit einer Zink-Bindetasche an einem Ende. Die konservierte Sequenz WRKYGQK ist für die direkte DNA-Bindung verantwortlich (Yamasaki *et al.*,

2005). Aufgrund des Glycins in der WRKYGQK Sequenz hat der β -Strang eine konvexe Struktur, die wiederum zu einem direkten Kontakt mit der DNA-Helix führt (Yamasaki *et al.*, 2011). Die Zink-Bindung scheint für die korrekte Faltung verantwortlich zu sein und Mutationen der Zink-bindenden Aminosäuren zerstört die DNA-Interaktion (Maeo *et al.*, 2001; Yamasaki *et al.*, 2005). Die Struktur der DNA-Bindedomäne von NF- κ B ist ein β -Scaffold mit zwei β -Sandwiches (Chen *et al.*, 1998; Weirauch, 2011). Die Aminosäuren innerhalb der fünf verschiedenen Loops zwischen den β -Strängen der DNA- und Dimerisierungsdomäne der RHD von NF- κ B p65 sind für die Interaktion mit der DNA-Sequenz verantwortlich (Chen *et al.*, 1998). Obwohl die Struktur von WRKY und NF- κ B Faktoren sehr verschieden ist, haben beide Faktoren β -Stränge als Strukturmotiv gemeinsam.

Bei der Aktivierung der basalen Immunantwort durch WRKY und NF- κ B Faktoren existieren Gemeinsamkeiten. Das NF- κ B Dimer aus p50 und p65 ist durch die Interaktion mit I κ B im Cytoplasma lokalisiert (Gilmore, 2006). Die Erkennung eines MAMPs führt zu einer Phosphorylierung von I κ B und anschließender Degradation durch das Proteasom. Das NF- κ B Heterodimer gelangt darauf in den Zellkern und aktiviert die Genexpression (Gilmore, 2006). Das pflanzliche *non-expressor of PR genes* (NPR1), auch *noninducible immunity* (NIM1) genannt, weist besonders in den *ankyrin* Domänen eine Homologie zu I κ B α auf (Ryals *et al.*, 1997). NPR1 ist ein wichtiger Regulator während der systemisch erworbenen Resistenz (SAR). Bei einer SAR kommt es zu einer Akkumulation von Salicylsäure, wodurch NPR1 in den Zellkern gelangt, dort mit TGA Faktoren interagiert und die Expression von Abwehrgenen reguliert (Zhang *et al.*, 1999; Després *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002). Des Weiteren ist die Aktivierung der Genexpression durch NF- κ B vergleichbar mit der WRKY33 Aktivierung. WRKY33 bildet einen Komplex mit der MAP-Kinase 4 Substrat (MSK) Protein MSK1 (Andreasson *et al.*, 2005). Nach MAMP-Erkennung wird MSK1 durch die MAP-Kinase 4 phosphoryliert und der Komplex mit WRKY33 aufgetrennt. Darauf gelangt WRKY33 in den Zellkern und reguliert die Genexpression (Qiu *et al.*, 2008). Interessanterweise ist in den Promotoren der WRKY33 Zielgene das WT-Box Kernmotiv GACTTT angereichert (Liu *et al.*, 2015).

Anhand der derzeitigen Daten ist es schwierig von einem gemeinsamen evolutionären Ursprung von NF- κ B und WRKY Faktoren zu sprechen. NF- κ B Faktoren scheinen spezifisch in Vertebraten und Arthropoden zu sein (Huguet *et al.*, 1997; Graef *et al.*, 2001). WRKY Faktoren treten hauptsächlich in Pflanzen auf. Jedoch wurden WRKY Proteine der Gruppe I in zwei Eukaryoten gefunden, die keine Photosynthese durchführen können, dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* und dem einzelligen Protisten *Giardia lamblia* (Ülker *et al.*, 2004). Strukturelle Ähnlichkeiten zu WRKY Faktoren wurden außerdem im pilzlichen Rcs1p Protein und dem GCM Faktor aus Metazoen gefunden (Babu *et al.*, 2006). In zwei Hypothesen zur Evolution von WRKY Faktoren wurden bisher weder NF- κ B noch ein gemeinsamer Vorfahre erwähnt (Rushton *et al.*, 2010).

Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten damit entweder auf eine konvergente Evolution oder einen bisher nicht beschriebenen gemeinsamen Ursprung von WRKY und NF- κ B Transkriptionsfaktoren hinweisen.

6. Zusammenfassung

Kürzlich entdeckte neue *microbe-associated molecular pattern* (MAMP)-responsive *cis*-Sequenzen enthalten die Kernsequenz GACTTT, welche als WT-Box bezeichnet wird. Abhängig vom Nukleotid vor der Kernsequenz wird die WT-Box in zwei unterschiedliche Typen unterteilt. Die Typ I WT-Box mit der Sequenz TGACTTTT und CGACTTTT interagiert mit WRKY Transkriptionsfaktoren, hingegen konnte bisher kein interagierendes Protein mit den Typ II WT-Boxen GGACTTTC, GGACTTTT und GGACTTTG identifiziert werden. Die Typ II WT-Boxen sind in *Arabidopsis thaliana* Protoplasten für eine MAMP-Responsivität notwendig. Um mögliche Transkriptionsfaktoren, die mit den Typ II WT-Boxen interagieren, zu identifizieren, wurden bioinformatische Analysen durchgeführt. Interessanterweise wird der Transkriptionsfaktor NF- κ B p65 aus Maus (*Mus musculus*) als Typ II WT-Box-bindendes Protein vorhergesagt. Ähnlich wie WRKY Faktoren in Pflanzen spielt NF- κ B p65 eine große Rolle in der basalen Immunität in Tieren. Aufgrund dessen wurde die Interaktion von NF- κ B p65 mit den Typ II WT-Boxen experimentell analysiert. NF- κ B p65 benötigt die Typ II WT-Boxen GGACTTTC, GGACTTTT und GGACTTTG zur Aktivierung der Reportergenexpression in pflanzlichen Zellen. Des Weiteren benötigt NF- κ B p65 die Typ II WT-Box ähnliche Sequenz aus dem *pathogenesis related 1* Promotor zur Aktivierung der Reportergenaktivität in Pflanzenzellen. *In vitro* benötigt NF- κ B p65 die WT-Box für eine direkte Bindung.

In Yeast One-Hybrid Screens mit einem Typ II WT-Box enthaltenden *cis*-regulatorischen Modul aus dem *WRKY30* Promotor wurden die WRKY Faktoren WRKY26, 40 und 41 selektiert. In pflanzlichen Zellen reprimieren WRKY26, 40 und 41 die MAMP-responsive Reportergenexpression. Um den Einfluss der WT-Box auf die von WRKY26 und 41 vermittelte Genexpression zu ermitteln, wurden beide Transkriptionsfaktoren in Aktivatoren durch Hinzufügen der GAL4 Aktivierungsdomäne (AD) umgewandelt. WRKY26AD benötigt die WT-Box zur vollen Aktivierung der Reportergenaktivität in Pflanzenzellen. *In vitro* bindet WRKY26, wie NF- κ B p65, an die Typ II WT-Box GGACTTTC. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass tierische und pflanzliche Transkriptionsfaktoren, die beide in der basalen Immunität beteiligt sind, an die gleiche *cis*-Sequenz binden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine Ähnlichkeit der basalen Immunität zwischen Tieren und Pflanzen in den konservierten MAMP-responsiven *cis*-Sequenzen und in der Erkennung der NF- κ B p65 und WRKY Bindestelle.

7. Literaturverzeichnis

Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Petersen, N. H., Zhu, S., Qiu, J. L., Micheelsen, P., Rocher, A., Petersen, M., Newman, M. A., Bjorn Nielsen, H., Hirt, H., Somsschich, I., Mattsson, O. und Mundy, J. (2005) The MAP kinase substrate MSK1 is a regulator of plant defense responses. *EMBO J* 24: 2579-2589

Arndt, L. C. (2018) Analyse einer möglichen Interaktion von WRKY40 und einem MAMP-responsiven *cis*-Element aus *Arabidopsis thaliana*. Bachelorarbeit Technische Universität Braunschweig

Ausubel, F. M. (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol* 6: 973 – 979

Babu, M. M., Iyer, L. M., Balaji, S. und Aravind, L. (2006) The natural history of the WRKY-GCM1 zinc fingers and the relationship between transcription factors and transposons. *Nucleic Acid Res* 34: 6505 – 6520

Bahlmann, A.-K. (2017) Identifikation der WRKY26 und WRKY41 responsiven Region eines *cis*-regulatorischen Moduls aus dem Promotor des *AtWRKY30* Gens. Masterarbeit Technische Universität Braunschweig

Baeuerle, P. A. und Henkel, T. (1994) Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12: 141 – 179

Bent, A. F. und Mackey, D. (2007) Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annu Rev Phytopathol* 45: 399 – 436

Besseau, S., Li, J. und Palva, E. T. (2012) WRKY54 and WRKY70 co-operate as negative regulators of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 63: 2667 – 2679

Birkenbihl, R. P., Diezel, C. und Somssich, I. E. (2012) *Arabidopsis* WRKY33 is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection. *Plant Physiol* 159: 266 – 285

Bolívar, I. C., Machens, F., Brill, Y., Romanov, A., Bülow, L. und Hehl, R. (2014) ‘*In silico* expression analysis’, a novel PathoPlant web-tool to identify abiotic and biotic stress conditions associated with specific *cis*-regulatory sequences. *Database (Oxford)* 2014:bau030

Bradford, M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72: 248 – 254

- Bülow, L., Schindler, M. und Hehl, R. (2007)** PathoPlant: a platform for microarray expression data to analyze co-regulated genes involved in plant defense responses. *Nucleic Acid Res* 35: D841 – D845
- Burton, Z. F., Opron, K., Wie, G. und Geiger, J. H. (2016)** A model for genesis of transcription systems. *Transcription* 7: 1 – 13
- Che, D., Jensen, S., Cai, L. und Liu, J. S. (2005)** BEST: binding-site estimation suite of tools. *Bioinformatics* 21: 2909 – 2911
- Chen, Y.-Q., Ghosh, S. und Ghosh, G. (1998)** A novel DNA recognition mode by the NF- κ B p65 homodimer. *Nat Struct Biol* 5: 67 – 73
- Chi, Y., Yang, Y., Zhou, Y., Zhou, J., Fan, B., Yu, J.-Q. und Chen, Z. (2013)** Protein-Protein Interactions in the Regulation of WRKY Transcription Factors. *Mol Plant* 6: 287 – 300
- Ciolkowski, I., Wanke, D., Birkenbihl, R. P. und Somssich, I. E. (2008)** Studies on DNA-binding selectivity of WRKY transcription factors lend structural clues into WRKY-domain function. *Plant Mol Biol* 68: 81 – 92
- Clough, S. J. und Bent, A. F. (1998)** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735 – 743
- Contreras-Moreira, B. (2010)** 3D-footprint: a database for the structural analysis of protein-DNA complexes. *Nucleic Acids Res* 38: D91-D97
- Coutu, C., Brandle, J., Brown, D., Brown, K., Miki, B., Simmonds, J. und Hegedus, D. D. (2007)** pORE: a modular binary vector series suited for both monocot and dicot plant transformation. *Transgenic Res* 16: 771 – 781
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M. und Leemans, J. (1985)** Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acid Res* 13: 4777 – 4788
- Delves, P. J. und Roitt, I. M. (2000)** The Immune System. *N Engl J Med* 343: 37 - 49
- Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E. und Fobert, P. R. (2000)** The Arabidopsis NPR1/NIM1 Protein Enhances the DNA Binding Activity of a Subgroup of the TGA Family of bZIP Transcription Factors. *Plant Cell* 12: 279 – 290

- Ding, Z. J., Yan, J. Y., Li, G. X., Wu, Z. C., Zhang, S. Q. und Zheng, S. J. (2014)** WRKY41 controls Arabidopsis seed dormancy via direct regulation of ABI3 transcript levels not downstream of ABA. *Plant J* 79: 810 – 823
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A.-M., Ayliffe, M. A. und Ellis, J. G. (2004)** The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. *Plant Cell* 16: 755 – 768
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A.-M., Teh, T., Wang, C.-I. A., Ayliffe, M. A., Kobe, B. und Ellis, J. G. (2006)** Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 8888 – 8893
- Dong, J., Chen, C. und Chen, Z. (2003)** Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol* 51: 21 – 37
- Duxbury, Z., Ma, Y., Furzer, O. J., Huh, S. U., Cevik, V., Jones, J. D. und Sarris, P. F. (2016)** Pathogen perception by NLRs in plant and animals: Parallel words. *Bioessays* 38: 769 – 781
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K. und Somssich, I. E. (1999)** Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J* 18: 4689 – 4699
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S. und Somssich, I. E. (2000)** The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* 5: 199 – 206
- Franco-Zorrilla, J. M., Lopez-Vidriero, I., Carrasco, J. L., Godoy, M., Vera, P. und Solano, R. (2014)** DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 2367 – 2372
- Gilmore, T. D. (2006)** Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25: 6680 – 6684
- Graef, I. A., Gastier, J. M., Francke, U. und Crabtree, G. R. (2001)** Evolutionary relationships among Rel domains indicate functional diversification by recombination. *PNAS* 98: 5740 – 5745
- Grimm, S. und Baeuerle, P. A. (1993)** The inducible transcription factor NF-κB: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem J* 290: 297 – 308
- Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nürnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W. S. und Schmelzer, E. (1995)** Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 4150 – 4157

- Hai, T. und Curran, T. (1991)** Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 3720 – 3724
- Haney, C. H., Urbach, J. und Ausubel, F. M. (2014)** Innate immunity in plants and animals. *Biochemist* 36: 40 - 44
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M. und Aderem, A. (2001)** The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410: 1099 – 1103
- Hehl, R. (2017)** From experiment-driven database analyses to database-driven experiments in *Arabidopsis thaliana* transcription factor research. *Plant Sci* 262: 141 – 147
- Higashi, K., Ishiga, Y., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. und Ichinose, Y. (2008)** Modulation of defense signal transduction by flagellin-induced WRKY41 transcription factor in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Genet Genomics* 279: 303 – 312
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. und Korenaga, T. (1999)** Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res* 27: 297 – 300
- Hoebe, K., Janssen, E. und Beutler, B. (2004)** The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 5: 971 - 974
- Huguet, C., Crepieux, P. und Laudet, V. (1997)** Rel/NF- κ B transcription factors and I κ B inhibitors: Evolution from a unique common ancestor. *Oncogene* 15: 2965 – 2974
- Hussain, R. M. F., Sheikh, A. H., Haider, I., Quareshy, M. und Linthorst, H. J. M. (2018)** Arabidopsis WRKY50 and TGA Transcription Factors Synergistically Activate Expression of *PR1*. *Front Plant Sci* 9: 930
- Jones, J. D. G. und Dangl, J. L. (2006)** The plant immune system. *Nature* 444: 323 – 329
- Jones, J. D. G., Vance, R. E. und Dangl, J. L. (2016)** Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science* 354: pii: aaf6395
- Kalde, M., Barth, M., Somssich, I. E. und Lippok, B. (2003)** Members of the Arabidopsis WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signalling pathways. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 295 – 305

- Kanofsky, K., Bahlmann, A.-K., Hehl, R. und Dong, D. X. (2017)** Combinatorial requirement of W- and WT-boxes in microbe-associated molecular pattern-responsive synthetic promoters. *Plant Cell Rep* 36: 971 – 986
- Kanofsky, K., Lehmeier, M., Schulze, J. und Hehl, R. (2016)** Analysis of microbe-associated molecular pattern-responsive synthetic promoters with the parsley protoplast system. *Methods Mol Biol* 1482: 163 – 174
- Kawai, T. und Akira, S. (2007)** Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *TRENDS Mol Med* 13: 460 – 469
- Kel, A., Kel-Margoulis, O., Badenko, V. und Wingender, E. (1999)** Recognition of NFATp/AP-1 composite elements within genes induced upon the activation of immune cells. *J Mol Biol* 288: 353 – 376
- Kim, H. S. und Delaney, T. P. (2002)** Over-expression of *TGA5*, which encodes a bZIP transcription factor that interacts with NIM1/NPR1, confers SAR-independent resistance in *Arabidopsis thaliana* to *Peronospora parasitica*. *Plant J* 32: 151 – 163
- Koschmann, J., Machens, F., Becker, M., Niemeyer, J., Schulze, J., Bülow, L., Stahl, D. J. und Hehl, R. (2012)** Integration of bioinformatics and synthetic promoters leads to the discovery of novel elicitor-responsive cis-regulatory sequences in Arabidopsis. *Plant Physiol* 160: 178 – 191
- Kourelis, J. und van der Hoorn, R. A. (2018)** Defended to the Nines: 25 Years of Resistance Gene Cloning Identifies Nine Mechanisms for R Protein Function. *Plant Cell* 30: 285 - 299
- Kunsch, C., Ruben, S. M. und Rosen, C. A. (1992)** Selection of optimal κ B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12: 4412 – 4421
- Lebel, E., Heifetz, P., Thorne, L., Uknes, S., Ryals, J. und Ward, E. (1998)** Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in Arabidopsis. *Plant J* 16: 223 – 233
- Lehmeier, M., Kanofsky, K., Hanco, E. K. R., Ahrendt, S., Wehrs, M., Machens, F. und Hehl, R. (2016)** Functional dissection of a strong and specific microbe-associated molecular pattern-responsive synthetic promoter. *Plant Biotechnol J* 14: 61 – 71
- Lelli, K. M., Slaterry, M. und Mann, R. S. (2012)** Disentangling the Many Layers of Eukaryotic Transcriptional Regulation. *Annu. Rev. Genet.* 46: 43 – 68
- Li, J., Brader, G., Kariola, T. und Palva, E. T. (2006)** WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *Plant J* 46: 477 – 491

- Li, J., Brader, G. und Palva, E. T. (2004)** The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 16: 319 – 331
- Li, S., Fu, Q., Chen, L., Huang, W. und Yu, D. (2011)** *Arabidopsis thaliana* WRKY25, WRKY26, and WRKY33 coordinate induction of plant thermotolerance. *Planta* 233: 1237 – 1252
- Li, Q. und Verma, I. M. (2002)** NF- κ B Regulation In The Immune System. *Nat Rev Immunol* 2: 725 - 734
- Liu, S., Kracher, B., Ziegler, J., Birkenbihl, R. P. und Somssich, I. E. (2015)** Negative regulation of ABA signaling by WRKY33 is critical for *Arabidopsis* immunity towards *Botrytis cinerea* 2100. *eLife* 4: e07295
- Machens, F., Becker, M., Umrath, F. und Hehl, R. (2014)** Identification of a novel type of WRKY transcription factor binding site in elicitor-responsive cis-sequences from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 84: 371 – 385
- Maeo, K., Hayashi, S., Kojima-Suzuki, H., Morikami, A. und Nakamura, K. (2001)** Role of Conserved Residues of the WRKY Domain in the DNA-binding of Tobacco WRKY Family Proteins. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 2428 – 2436
- Mahony, S. und Benos, P. V. (2007)** STAMP: a web tool for exploring DNA-binding motif similarities. *Nucleic Acids Res* 35: W253 – W258
- May, M. J. und Ghosh, S. (1997)** Rel/NF- κ B and I κ B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol* 8: 63 – 73
- Meißner, L. (2018)** Analyse des Einflusses der WT-Box auf die NF- κ B p65 vermittelte Reportergenaktivität in *Arabidopsis thaliana*. Masterarbeit Technische Universität Braunschweig
- Miao, Y., Laun, T., Zimmermann, P. und Zentgraf, U. (2004)** Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 55: 853 – 867
- Mitsuda, N., Ikeda, M., Takada, S., Takiguchi, Y., Kondou, Y., Yoshizumi, T., Fujita, M., Shinozaki, K., Matsui, M. und Ohme-Takagi, M. (2010)** Efficient yeast one-/two-hybrid screening using a library composed only of transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 51: 2145 – 2151
- Möller, A. (2016)** Analyse eines *cis*-regulatorischen Moduls aus dem Promotor des *PR1*-Gens aus *Arabidopsis thaliana* und seiner Interaktion mit Maus NF- κ B. Bachelorarbeit Technische Universität Braunschweig
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B. und Piater, L. (2004)** Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* 198: 249 – 266

- O'Malley, R. C., Huang, S. S., Song, L., Lewsey, M. G., Bartlett, A., Nery, J. R., Galli, M., Gallavotti, A. und Ecker, J. R. (2016)** Cistrome and Epicistrome Features Shape the Regulatory DNA Landscape. *Cell* 165: 1280 – 1292
- Palaniswamy, S. K., James, S., Sun, H., Lamb, R. S., Davuluri, R. V. und Grotewold, E. (2006)** AGRIS and AtRegNet. A platform to link cis-regulatory elements and transcription factors into regulatory networks. *Plant Physiol* 140: 818 – 829
- Pandey, S. P., Roccaro, M., Schon, M., Logemann, E. und Somssich, I. E. (2010)** Transcriptional reprogramming regulated by WRKY18 and WRKY40 facilitates powdery mildew infection of *Arabidopsis*. *Plant J* 64: 912 – 923
- Parkin, J. und Cohen, B. (2001)** An overview of the immune system. *Lancet* 357: 1777 – 1789
- Perez-Rodriguez, P., Riano-Pachon, D. M., Correa, L. G., Rensing, S. A., Kersten, B. und Mueller-Roeber, B. (2010)** PlantTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucleic Acids Res* 38: D822 – D827
- Qiu, J.-L., Fiil, B. K., Petersen, K., Nielsen, H. B., Botanga, C. J., Thorgrimsen, S., Palma, K., Suarez-Rodriguez, M. C., Sandbech-Clausen, S., Lichota, J., Brodersen, P., Grasser, K. D., Mattsson, O., Glazebrook, J., Mundy, J. und Petersen, M. (2008)** *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *EMBO J* 27: 2214 – 2221
- Rushton, P. J., Somssich, I. E., Ringler, P. und Shen, Q. J. (2010)** WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci* 15: 247 – 258
- Rushton, P. J., Torres, J. T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K. und Somssich, I. E. (1996)** Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO J* 15: 5690 – 5700
- Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H.-Y., Johnson, J., Delaney, T. P., Jesse, T., Vos, P. und Uknes, S. (1997)** The *Arabidopsis NIM1* Protein Shows Homolgy to the Mammalian Transcription Factor Inhibitor IκB. *Plant Cell* 9: 425 – 439
- Sambrook, J. und Russwell, D. W. (2001)** Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sandmann, A. (2017)** Analyse von Typ II WT-Box-enthaltenden *cis*-Sequenzen in *Arabidopsis thaliana* Protoplasten. Bachelorarbeit Technische Universität Braunschweig

- Scarpeci, T. E., Zanor, M. I., Carrillo, N., Mueller-Roeber, B. und Valle, E. M. (2008)** Generation of superoxide anion in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* during active photosynthesis: a focus on rapidly induced genes. *Plant Mol Biol* 6: 361 – 378
- Scarpeci, T. E., Zanor, M. I., Mueller-Roeber, B. und Valle, E. M. (2013)** Over-expression of AtWRKY30 enhances abiotic stress tolerance during early growth stages in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 83: 265 – 277
- Schlücking, K., Edel, K. H., Drerup, M. M., Köster, P., Eckert, C., Steinhorst, L., Waadt, R., Batistic, O. und Kudla, J. (2013)** A New β -Estradiol-Inducible Vector Set that Facilitates Easy Construction and Efficient Expression of Transgenes Reveals CBL3-Dependent Cytoplasm to Tonoplast Translocation of CIPK5. *Mol Plant* 6: 1814 – 1829
- Sebastian A. und Contreras-Moreira, B. (2014)** footprintDB: a database of transcription factors with annotated cis elements and binding interfaces. *Bioinformatics* 30: 258 – 265
- Sen, R. und Baltimore, D. (1986)** Inducibility of κ Immunoglobulin Enhancer-Binding Protein NF- κ B by a Posttranslational Mechanism. *Cell* 47: 921 – 928
- Shang, Y., Yan, L., Liu, Z. Q., Cao, Z., Mei, C., Xin, Q., Wu, F. Q., Wang, X. F., Du, S. Y., Jiang, T., Zhang, X. F., Zhao, R., Sun, H. L., Liu, R., Yu, Y. T. und Zhang, D. P. (2010)** The Mg-chelatase H subunit of *Arabidopsis* antagonizes a group of WRKY transcription repressors to relieve ABA-responsive genes of inhibition. *Plant Cell* 22: 1909 – 1935
- Staar, M. (2017)** Analyse der Interaktion tierischer und pflanzlicher Transkriptionsfaktoren mit einem Pathogen-responsiven *cis*-Element aus *Arabidopsis thaliana*. Bachelorarbeit Technische Universität Braunschweig
- Steffens, N. O., Galuschka, C., Schindler, M., Bülow, L. und Hehl, R. (2004)** AthaMap: an online resource for in silico transcription factor binding sites in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nucleic Acids Res* 32: D368 – D372
- Strauch, C. J. (2018)** Analyse der Interaktion des murinen NF- κ B p65 mit WT-Box enthaltenden *cis*-Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana*. Masterarbeit Technische Universität Braunschweig
- Töpfer, R., Maas, C., Horicke-Grandpierre, C., Schell, J. und Steinbiss H. H. (1993)** Expression vectors for high-level gene expression in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Methods Enzymol* 217: 67 – 78

- Ueberla, K., Lu, Y., Chung, E. und Haseltine, W. A. (1993)** The NF- κ B p65 Promoter. *J Acquir Immune Defic Syndr* 6: 227 – 230
- Ülker, B. und Somssich, I. E. (2004)** WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr Opin Plant Biol* 7: 491 – 498
- Urban, M. B. und Baeuerle, P. A. (1990)** The 65-kD subunit of NF- κ B is a receptor for I κ B and a modulator of DNA-binding specificity. *Genes Dev* 4: 1975 – 1984
- Urban, M. B., Schreck, R. und Baeuerle, P. A. (1991)** NF- κ B contacts DNA by a heterodimer of the p50 and p65 subunit. *EMBO J* 10: 1817 – 1825
- Van Aken, O., Zhang, B., Law, S., Narsai, R. und Whelan, J. (2013)** AtWRKY40 and AtWRKY63 modulate the expression of stress-responsive nuclear genes encoding mitochondrial and chloroplast proteins. *Plant Physiol* 162: 254 – 271
- Wehner, N., Hartmann, L., Ehlert, A., Bottner, S., Onate-Sanches, L. und Dröge-Laser, W. (2011)** High-throughput protoplast transactivation (PTA) system for the analysis of Arabidopsis transcription factor function. *Plant J* 68: 560 – 569
- Weirauch, M. T. und Hughes, T. R. (2011)** A catalogue of eukaryotic transcription factor types, their evolutionary origin, and species distribution. *Subcell Biochem* 52: 25 – 73
- Weirauch, M. T., Yang, A., Albu, M., Cote, A. G., Montenegro-Montero, A., Drewe, P., Najafabadi, H. S., Lambert, S. A., Mann, I., Cook, K., Zheng, H., Goity, A., van Bakel, H., Lozano, J. C., Galli, M., Lewsey, M. G., Huang, E., Mukherjee, T., Chen, X., Reece-Hoyes, J. S., Govindarajan, S., Shaulsky, G., Walhout, A. J., Bouget, F. Y., Ratsch, G., Larrondo, L. F., Ecker, J. R. und Hughes, T. R. (2014)** Determination and inference of eukaryotic transcription factor sequence specificity. *Cell* 158: 1431 – 1443
- Wu, F. H., Shen, S. C., Lee, L. Y., Lee, S. H., Chan, M. T. und Lin, C. S. (2009)** Tape-Arabidopsis Sandwich-a simpler Arabidopsis protoplast isolation method. *Plant Methods* 5: 16
- Xu, X., Chen, C., Fan, B. und Chen, Z. (2006)** Physical and functional interactions between pathogen-induced Arabidopsis WRKY18, WRKY40, and WRKY60 transcription factors. *Plant Cell* 18: 1310 – 1326
- Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M., Tateno, M., Yamasaki, T., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Tomo, Y., Hayami, N., Terada, T., Shirouzu, M., Tanaka, A., Seki, M., Shinozaki, K. und Yokoyama, S. (2005)** Solution Structure of an Arabidopsis WRKY DNA Binding Domain. *Plant Cell* 17: 944 – 956

- Yamasaki, K., Kigawa, T., Watanabe, S., Inoue, M., Yamasakie, T., Seki, M., Shinozaki, K. und Yokoyama, S. (2012)** Structural Basis for Sequence-specific DNA Recognition by an *Arabidopsis* WRKY Transcription Factor. *J Biol Chem* 287: 7683 - 7691
- Yanagisawa, S. und Schmidt, R. J. (1999)** Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors. *Plant J* 17: 209 – 214
- Yoo, S. D., Cho, Y. H. und Sheen, J. (2007)** *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc* 2: 1565 - 1572
- Yue, J. X., Meyers, B. C., Chen, J. Q., Tian, D. und Yang, S. (2012)** Tracing the origin and evolutionary history of plant nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes. *New Phytol* 193: 1049 – 1063
- Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X. und Dong, X. (1999)** Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-1* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6523 – 6528
- Zheng, Z., Qamar, S. A., Chen, Z. und Mengiste, T. (2006)** *Arabidopsis* WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J* 48: 592 – 605
- Zhou, M., Lu, Y., Bethke, G., Harrison, B. T., Hatsugai, N., Katagiri, F. und Glazebrook, J. (2018)** WRKY70 prevents axenic activation of plant immunity by direct repression of SARD1. *New Phytol* 217: 700 – 712
- Zhou, M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J. und Klessig, D. F. (2000)** NPR1 Differentially Interacts with Members of the TGA/OBF Family of Transcription Factors That Bind an Element of the *PR-1* Gene Required for Induction by Salicylic Acid. *MPMI* 13: 191 – 202
- Zipfel, C. und Felix, G. (2005)** Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr Opin Plant Biol* 8: 353 – 360
- Zou, C., Sun, K., Mackaluso, J. D., Seddon, A. E., Jin, R., Thomashow, M. F. und Shiu, S. H. (2011)** Cis-regulatory code of stress-responsive transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 14992 - 14997

8. Anhang

8.1. Reporterogenaktivitäten des transienten Reporterogen-Assays

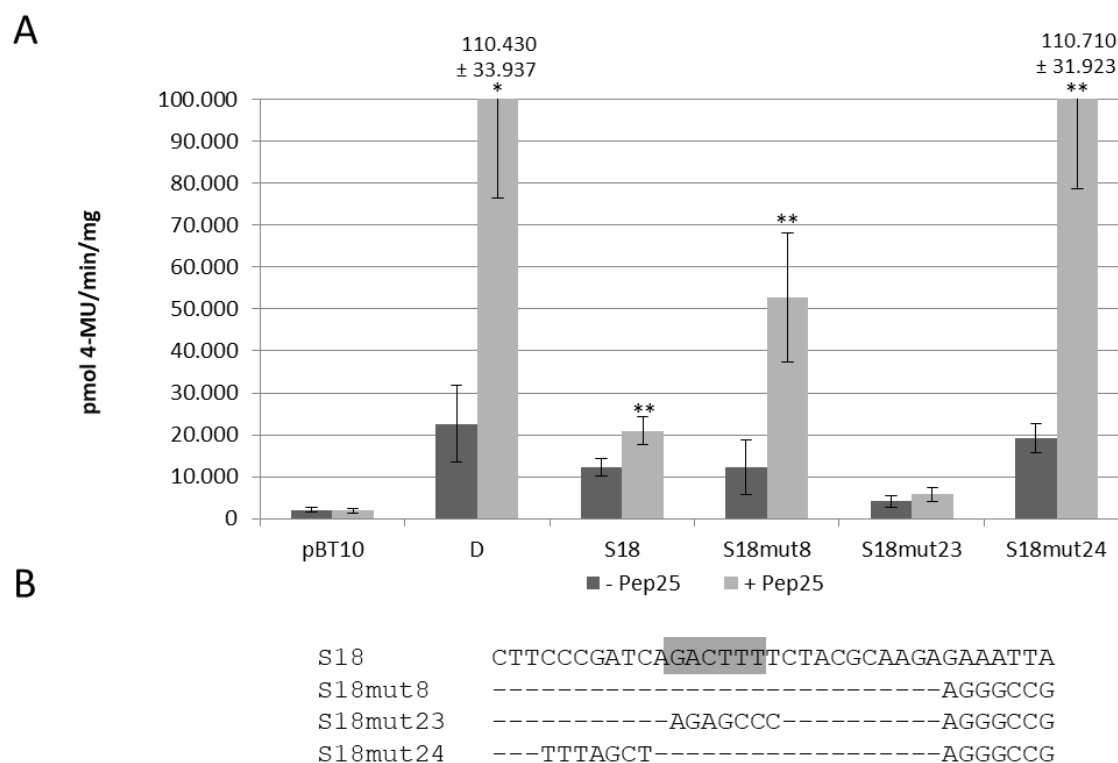


Abbildung 36: Pep25-Responsivität zweier verschiedener Doppelmutationen der Sequenz 18 in Petersilienprotoplasten

Transienter Reportergen-Assay im Petersilienprotoplastensystem. Nach der Transformation der Protoplasten wurden diese mit oder ohne dem Elicitor Pep25 behandelt. Der leere Vektor pBT10GUS-d35SLUC (pBT10) und der Vektor mit vier Kopien des Pep25-responsiven D-Elements (D) dienen als negativ und positiv Kontrolle. A: Transienter Reportergen-Assay der Mutationen 23 und 24 von Sequenz 18 im Vergleich zur Wildtyp Sequenz und S18mut8. Die Berechnung der statistischen Unterschiede ist jeweils auf Pep25-behandelte bzw. unbehandelte Proben bezogen (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). B: Sequenz 18 und die verschiedenen Mutationen. Veränderte Nukleotide der Mutationen werden gezeigt; unveränderte werden nicht gezeigt (-). Die WT-Box ist grau hinterlegt. Die entsprechenden Werte zur Abbildung sind in Tabelle 19 aufgeführt.

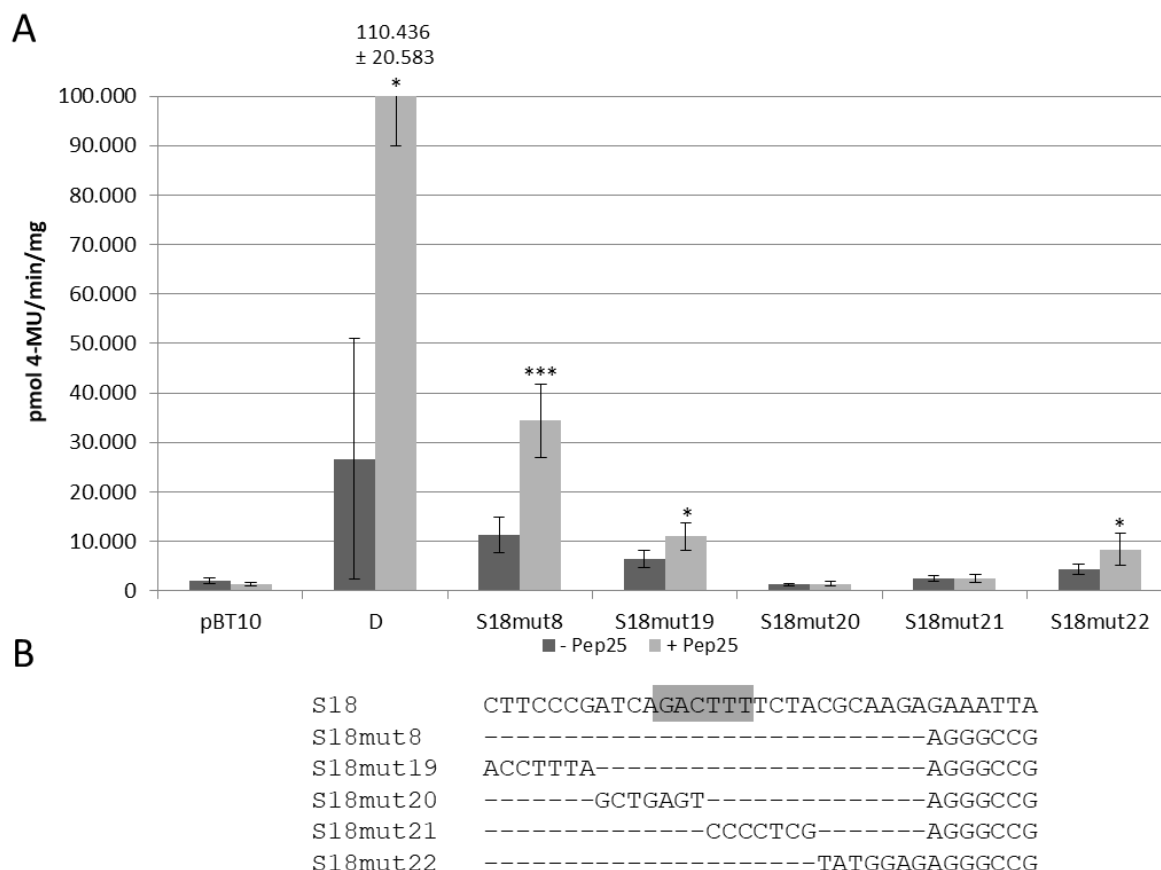


Abbildung 37: Pep25-Responsivität verschiedener Doppelmutationen der Sequenz 18 in Petersilienprotoplasten

Transienter Reportergen-Assay im Petersilienprotoplastensystem (Bachelorarbeit Laureen Arndt, 2018). Nach der Transformation der Protoplasten wurden diese mit oder ohne dem Elicitor Pep25 behandelt. Der leere Vektor pBT10GUS-d35SLUC (pBT10) und der Vektor mit vier Kopien des Pep25-responsiven D-Elements (D) dienen als negativ und positiv Kontrolle. A: Transienter Reportergen-Assay der Mutationen 19 bis 22 von Sequenz 18 im Vergleich zur Sequenz 18mut8. Die Berechnung der statistischen Unterschiede ist jeweils auf Pep25-behandelte bzw. unbehandelte Proben bezogen (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$). B: Sequenz 18 und die verschiedenen Mutationen. Veränderte Nukleotide der Mutationen werden gezeigt; unveränderte werden nicht gezeigt (-). Die WT-Box ist grau hinterlegt. Die entsprechenden Werte zur Abbildung sind in Tabelle 20 aufgeführt.

8.2. Auflistung der Enzymaktivitäten und Induktionsfaktoren des transienten Reportergen-Assays

Im Folgenden sind die verschiedenen normierten Reportergenaktivitäten und Induktionsfaktoren der transienten Assays aufgelistet.

Tabelle 12: Normierte GUS-Werte der Kointransformation der *cis*-Sequenz 24 im pBT10 Vektor zusammen mit den verschiedenen NF- κ B p65 Konstrukten im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 18)

| Konstrukte | Experiment | GUS-Aktivität | Mittelwert | Std.abw. | t-Test |
|------------|------------|---------------|------------|----------|--------|
| S24 + pORE | 1 | 3091,06 | 2036,51 | 843,08 | |
| | | 1808,11 | | | |
| | | 2900,81 | | | |

| | | | | | |
|-----------------------|---|-----------|-----------|----------|--------|
| | | 925,55 | | | |
| | | 2333,64 | | | |
| | 2 | 2828,37 | | | |
| | | 655,08 | | | |
| | | 1178,89 | | | |
| | | 1331,00 | | | |
| | 3 | 2642,78 | | | |
| | | 3055,17 | | | |
| | | 1687,73 | | | |
| | | 66118,11 | | | |
| | 1 | 70107,90 | | | |
| | | 131310,93 | | | |
| | | 94982,96 | | | |
| | | 81213,85 | | | |
| S24 + p65-pORE | 2 | 74146,06 | 80160,04 | 18843,57 | 0,0000 |
| | | 89232,51 | | | |
| | | 84444,13 | | | |
| | | 80832,77 | | | |
| | 3 | 72230,35 | | | |
| | | 58584,56 | | | |
| | | 58716,32 | | | |
| | | 145922,50 | | | |
| | 1 | 138872,46 | | | |
| | | 121433,12 | | | |
| | | 108570,67 | | | |
| | | 114513,81 | | | |
| | | 106669,81 | | | |
| | | 126299,19 | | | |
| | | 145159,59 | | | |
| S24 + SV40-p65-pORE | 2 | 140524,79 | 123308,02 | 19749,24 | 0,0000 |
| | | 150673,42 | | | |
| | | 127217,45 | | | |
| | | 114609,08 | | | |
| | | 117192,01 | | | |
| | | 95786,25 | | | |
| | 3 | 156250,89 | | | |
| | | 128423,77 | | | |
| | | 86341,53 | | | |
| | | 95084,03 | | | |
| | | 178591,17 | | | |
| | 1 | 150827,44 | | | |
| | | 202068,32 | | | |
| S24 + GAL4AD-p65-pORE | | 257097,01 | 214054,66 | 31551,00 | 0,0000 |
| | | 204923,17 | | | |
| | | 190505,52 | | | |
| | 2 | 213855,57 | | | |
| | | 244270,38 | | | |

| | | | | | |
|--------------------------------|---|-----------|-----------|----------|--------|
| | | 217361,23 | | | |
| | | 240263,69 | | | |
| | | 211033,35 | | | |
| | | 208282,17 | | | |
| | 3 | 180203,85 | | | |
| | | 228433,09 | | | |
| | | 284966,14 | | | |
| | | 212192,39 | | | |
| | | 196634,37 | | | |
| | 1 | 220408,74 | | | |
| | | 239817,28 | | | |
| | | 237777,27 | | | |
| | | 224180,72 | | | |
| S24 + SV40-GAL4AD- p65-pORE | 2 | 261704,79 | 230871,96 | 50348,55 | 0,0000 |
| | | 250181,63 | | | |
| | | 215251,08 | | | |
| | | 157428,14 | | | |
| | 3 | 160753,09 | | | |
| | | 245564,10 | | | |
| | | 360762,33 | | | |

Tabelle 13: Normierte GUS-Werte der Kotretransformation von NF- κ B p65 mit den verschiedenen Tetrameren der *cis*-Sequenzen aus Motivgruppe 27 im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 19)

| Konstrukte | Experiment | pORE | Mittelwert | Std.abw. | p65-pORE | Mittelwert | Std.abw. |
|------------|------------|----------|------------|----------|-----------|------------|----------|
| | 1 | 7072,68 | | | 19426,84 | | |
| | | 3699,27 | | | 11584,68 | | |
| | 2 | 1682,08 | | | 7332,76 | | |
| | | 1390,75 | | | 6999,73 | | |
| | 3 | 2343,05 | | | 13080,37 | | |
| | | 2669,45 | | | 20667,69 | | |
| | 4 | 3720,38 | | | 17998,95 | | |
| | | 2960,53 | | | 18383,71 | | |
| pBT10 | 5 | 3709,74 | 4317,68 | 1891,95 | 14928,79 | 17339,88 | 5261,28 |
| | | 5887,39 | | | 13228,33 | | |
| | 6 | 6213,97 | | | 23006,65 | | |
| | | 6985,58 | | | 18771,21 | | |
| | 7 | 4098,52 | | | 19769,24 | | |
| | | 4630,84 | | | 25877,79 | | |
| | 8 | 8330,82 | | | 15901,54 | | |
| | | 5230,42 | | | 17673,25 | | |
| | 9 | 3939,32 | | | 24991,79 | | |
| | | 3153,51 | | | 22494,59 | | |
| | | 26101,86 | | | 131046,07 | | |
| S15 | 1 | 16038,66 | 15378,66 | 6291,36 | 95905,33 | 123529,70 | 39847,90 |
| | | 14718,18 | | | 92008,27 | | |

| | | | | | | | |
|-----|---|-----------------|----------|----------|------------------|-----------|----------|
| | | <u>12825,57</u> | | | <u>102989,90</u> | | |
| | | 11101,13 | | | 91332,74 | | |
| | 2 | 8320,14 | | | 70737,03 | | |
| | | 8667,42 | | | 114105,80 | | |
| | | <u>7217,12</u> | | | <u>104833,67</u> | | |
| | | 27901,63 | | | 149371,26 | | |
| | 3 | 16123,23 | | | 131225,08 | | |
| | | 19189,55 | | | 211996,50 | | |
| | | 16339,42 | | | 186804,74 | | |
| S18 | | 25944,29 | | | 111177,56 | | |
| | 1 | 14880,67 | | | 103456,02 | | |
| | | 22098,13 | | | 114548,15 | | |
| | | <u>28464,71</u> | | | <u>119541,83</u> | | |
| | | 11290,76 | | | 122141,72 | | |
| | 2 | 11811,46 | 21546,14 | 11389,29 | 135726,69 | 153377,47 | 63966,00 |
| | | 14446,75 | | | 102931,20 | | |
| | | <u>12058,23</u> | | | <u>110813,33</u> | | |
| | | 54688,13 | | | 196505,10 | | |
| | 3 | 22539,58 | | | 157060,58 | | |
| | | 20906,25 | | | 304409,48 | | |
| | | <u>19424,77</u> | | | <u>262217,99</u> | | |
| | | 7370,02 | | | 25171,13 | | |
| | 1 | 6945,97 | | | 18898,86 | | |
| S20 | | 6692,64 | | | 19921,59 | | |
| | | <u>6788,60</u> | | | <u>18441,00</u> | | |
| | | 16870,22 | | | 29824,35 | | |
| | 2 | 11657,19 | 11648,38 | 3878,65 | 21629,12 | 26259,55 | 6232,29 |
| | | 15823,67 | | | 29120,74 | | |
| | | <u>11485,02</u> | | | <u>31292,99</u> | | |
| | | 12397,09 | | | 41760,11 | | |
| | 3 | 13884,38 | | | 27324,71 | | |
| | | 18100,64 | | | 26021,82 | | |
| | | <u>11765,10</u> | | | <u>25708,24</u> | | |
| | | 3785,75 | | | 10028,16 | | |
| | 1 | 3459,52 | | | 11947,25 | | |
| | | 4996,15 | | | 18119,07 | | |
| | | <u>4141,72</u> | | | <u>11444,41</u> | | |
| S21 | | 7306,99 | | | 35730,41 | | |
| | 2 | 5976,04 | 7254,22 | 2684,21 | 14748,28 | 18639,65 | 7118,35 |
| | | 9866,62 | | | 18231,97 | | |
| | | <u>11686,84</u> | | | <u>15704,34</u> | | |
| | | 7534,05 | | | 24803,69 | | |
| | 3 | 8159,69 | | | 20290,36 | | |
| | | 9625,12 | | | 27059,35 | | |
| | | <u>10512,17</u> | | | <u>15568,46</u> | | |
| | | 8043,22 | | | 17363,81 | | |
| | 1 | 7362,46 | 8071,98 | 2434,78 | 14471,29 | 22397,92 | 7693,76 |

| | | | | | | | |
|-----|---|----------|----------|----------|-----------|----------|----------|
| | | 4384,76 | | | 11887,98 | | |
| | | 4764,18 | | | 13321,71 | | |
| | | 9469,90 | | | 21435,20 | | |
| | 2 | 6305,80 | | | 18131,56 | | |
| | | 9054,36 | | | 35254,65 | | |
| | | 9527,35 | | | 30839,28 | | |
| | | 13036,14 | | | 30917,74 | | |
| | 3 | 5473,16 | | | 19687,76 | | |
| | | 10463,85 | | | 32021,42 | | |
| | | 8978,63 | | | 23442,65 | | |
| | | 20170,68 | | | 67508,41 | | |
| | 1 | 19273,04 | | | 38524,45 | | |
| | | 24578,78 | | | 49415,38 | | |
| | | 19121,74 | | | 31650,89 | | |
| | | 21799,17 | | | 78516,26 | | |
| S23 | 2 | 23434,08 | 32002,40 | 15068,78 | 57804,23 | 58558,84 | 15176,87 |
| | | 60828,65 | | | 85942,40 | | |
| | | 40772,22 | | | 57330,89 | | |
| | | 64235,89 | | | 72463,38 | | |
| | 3 | 25570,40 | | | 60847,22 | | |
| | | 36363,95 | | | 54685,38 | | |
| | | 27880,15 | | | 48017,20 | | |
| | | 3158,84 | | | 52944,82 | | |
| | 1 | 1738,64 | | | 52537,51 | | |
| | | 3473,82 | | | 96063,43 | | |
| | | 2869,55 | | | 53137,70 | | |
| | | 3089,64 | | | 87165,58 | | |
| | 2 | 11398,50 | | | 64680,16 | | |
| | | 2878,91 | | | 51506,09 | | |
| | | 2746,58 | | | 51887,50 | | |
| | | 3159,16 | | | 122844,70 | | |
| | 3 | 3292,13 | | | 83710,81 | | |
| | | 1360,82 | | | 72401,42 | | |
| | | 4654,75 | | | 125407,15 | | |
| S24 | | 2000,83 | 2890,72 | 2187,93 | 55684,15 | 77931,79 | 26805,95 |
| | 4 | 1005,99 | | | 90298,21 | | |
| | | 2072,34 | | | 127008,96 | | |
| | | 1103,17 | | | 48293,67 | | |
| | | 1758,76 | | | 93618,97 | | |
| | 5 | 1957,97 | | | 72450,03 | | |
| | | 2129,10 | | | 139922,30 | | |
| | | 1197,64 | | | 60324,89 | | |
| | | 1371,41 | | | 54199,17 | | |
| | 6 | 1447,07 | | | 73432,56 | | |
| | | 2534,94 | | | 70521,15 | | |
| | | 6976,70 | | | 70321,92 | | |

Tabelle 14: Induktionsfaktoren der Kotransformation von NF- κ B p65 mit den verschiedenen Tetrameren der *cis*-Sequenzen aus Motivgruppe 27 im Petersilienprotoplastensystem (Werte aus Tabelle 13 und Abbildung 19)

| Konstrukte | Induktionsfaktor | Mittelwert | Std.abw. | t-Test |
|------------|------------------|------------|----------|--------|
| pBT10 | 2,75 | 4,53 | 1,65 | |
| | 3,13 | | | |
| | 4,36 | | | |
| | 5,03 | | | |
| | 5,58 | | | |
| | 7,74 | | | |
| | 4,84 | | | |
| | 6,21 | | | |
| | 4,02 | | | |
| | 2,25 | | | |
| | 3,70 | | | |
| | 2,69 | | | |
| | 4,82 | | | |
| | 5,59 | | | |
| | 1,91 | | | |
| | 3,38 | | | |
| | 6,34 | | | |
| | 7,13 | | | |
| S15 | 5,02 | 8,26 | 3,07 | 0,0005 |
| | 5,98 | | | |
| | 6,25 | | | |
| | 8,03 | | | |
| | 8,23 | | | |
| | 8,50 | | | |
| | 13,16 | | | |
| | 14,53 | | | |
| | 5,35 | | | |
| | 8,14 | | | |
| | 11,05 | | | |
| | 11,43 | | | |
| S18 | 4,29 | 6,30 | 3,94 | 0,0069 |
| | 6,95 | | | |
| | 5,18 | | | |
| | 4,20 | | | |
| | 10,82 | | | |
| | 11,49 | | | |
| | 7,12 | | | |
| | 9,19 | | | |
| | 3,59 | | | |
| | 6,97 | | | |
| | 14,56 | | | |
| | 13,50 | | | |
| S20 | 3,42 | 2,71 | 0,82 | 0,0001 |
| | 2,72 | | | |

| | | | | |
|-----|-------|-------|-------|--------|
| | 2,98 | | | |
| | 2,72 | | | |
| | 1,77 | | | |
| | 1,86 | | | |
| | 1,84 | | | |
| | 2,72 | | | |
| | 3,37 | | | |
| | 1,97 | | | |
| | 1,44 | | | |
| | 2,19 | | | |
| | 2,65 | | | |
| | 3,45 | | | |
| | 3,63 | | | |
| | 2,76 | | | |
| | 4,89 | | | |
| S21 | 2,47 | 2,66 | 0,81 | 0,0012 |
| | 1,85 | | | |
| | 1,34 | | | |
| | 3,29 | | | |
| | 2,49 | | | |
| | 2,81 | | | |
| | 1,48 | | | |
| | 2,16 | | | |
| | 1,97 | | | |
| | 2,71 | | | |
| | 2,80 | | | |
| | 2,26 | | | |
| S22 | 2,88 | 2,70 | 0,63 | 0,0006 |
| | 3,89 | | | |
| | 3,24 | | | |
| | 2,37 | | | |
| | 3,60 | | | |
| | 3,06 | | | |
| | 2,61 | | | |
| | 3,35 | | | |
| | 2,00 | | | |
| | 2,01 | | | |
| | 1,66 | | | |
| | 3,60 | | | |
| S23 | 2,47 | 2,05 | 0,74 | 0,0000 |
| | 1,41 | | | |
| | 1,41 | | | |
| | 1,13 | | | |
| | 2,38 | | | |
| | 1,50 | | | |
| | 1,72 | | | |
| S24 | 16,76 | 34,51 | 19,43 | 0,0000 |

30,22
 27,65
 18,52
 28,21
 5,67
 17,89
 18,89
 38,89
 25,43
 53,20
 26,94
 27,83
 89,76
 61,29
 43,78
 53,23
 37,00
 65,72
 50,37
 39,52
 50,75
 27,82
 10,08

Tabelle 15: Normierte GUS-Werte der Kotransformation von NF- κ B p65 mit den Tetrameren der *cis*-Sequenzen 15 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 20)

| Konstrukte | Experiment | pORE | Mittelwert | Std.abw. | p65-pORE | Mittelwert | Std.abw. |
|------------|------------|----------|------------|----------|-----------|------------|----------|
| S15 | 1 | 9890,81 | 10148,21 | 4082,13 | 101539,96 | 103383,20 | 27587,57 |
| | | 9615,62 | | | 90478,50 | | |
| | | 9394,77 | | | 94774,11 | | |
| | | 7953,42 | | | 105334,94 | | |
| | 2 | 17327,49 | | | 149408,24 | | |
| | | 17858,46 | | | 147203,80 | | |
| | | 17395,65 | | | 148248,74 | | |
| | | 18742,12 | | | 164157,29 | | |
| | 3 | 13592,65 | | | 102213,02 | | |
| | | 12416,90 | | | 105961,32 | | |
| | | 11403,98 | | | 91769,72 | | |
| | | 12839,87 | | | 92966,56 | | |
| | 4 | 8118,40 | | | 94202,16 | | |
| | | 7361,57 | | | 113764,19 | | |
| | | 7960,51 | | | 104069,36 | | |
| | | 8605,94 | | | 122223,99 | | |
| | 5 | 8919,47 | | | 102346,82 | | |
| | | 6911,64 | | | 96749,97 | | |

| | | | | | | | |
|----------|---|----------|---------|---------|-----------|----------|----------|
| | | 7569,17 | | | 98955,60 | | |
| | | 7314,67 | | | 108003,92 | | |
| | | 6335,83 | | | 61396,28 | | |
| | 6 | 4354,98 | | | 78459,49 | | |
| | | 5842,49 | | | 56960,35 | | |
| | | 5830,59 | | | 50008,38 | | |
| | | 11652,38 | | | 24119,34 | | |
| | 1 | 11900,15 | | | 22969,56 | | |
| | | 10724,64 | | | 25649,87 | | |
| | | 9910,15 | | | 35266,91 | | |
| | | 10689,09 | | | 19699,16 | | |
| S15mut12 | 2 | 8316,45 | 8105,42 | 2759,09 | 18274,01 | 20172,65 | 6491,35 |
| | | 6885,71 | | | 21468,68 | | |
| | | 8114,83 | | | 22702,53 | | |
| | | 4952,96 | | | 14828,43 | | |
| | 3 | 5297,01 | | | 12079,53 | | |
| | | 3732,63 | | | 13184,67 | | |
| | | 5089,02 | | | 11829,09 | | |
| | | 7205,05 | | | 114633,77 | | |
| | 1 | 6834,44 | | | 74701,12 | | |
| | | 5564,57 | | | 101555,11 | | |
| | | 6943,94 | | | 96127,65 | | |
| | | 5736,48 | | | 108673,80 | | |
| S15mut5 | 2 | 3981,87 | 5944,43 | 1209,08 | 134381,71 | 91641,89 | 24718,10 |
| | | 5261,62 | | | 96789,00 | | |
| | | 5438,07 | | | 120019,04 | | |
| | | 4584,44 | | | 68460,83 | | |
| | 3 | 5126,16 | | | 67833,41 | | |
| | | 8563,39 | | | 50620,10 | | |
| | | 6093,16 | | | 65907,12 | | |
| | | 7269,36 | | | 19667,89 | | |
| | 1 | 8586,97 | | | 24111,01 | | |
| | | 10762,40 | | | 23160,05 | | |
| | | 7722,22 | | | 24336,09 | | |
| | | 14171,04 | | | 24854,92 | | |
| S15mut4 | 2 | 12195,02 | 9600,33 | 2110,27 | 23240,99 | 21013,55 | 3435,03 |
| | | 11687,79 | | | 22256,35 | | |
| | | 10362,02 | | | 24305,97 | | |
| | | 8786,90 | | | 17868,91 | | |
| | 3 | 7823,70 | | | 16590,86 | | |
| | | 8095,32 | | | 15447,87 | | |
| | | 7741,16 | | | 16321,72 | | |
| | | 8866,53 | | | 64233,98 | | |
| | 1 | 6871,13 | | | 56918,30 | | |
| S15mutd | | 5787,45 | 9532,28 | 2665,06 | 58206,15 | 60228,17 | 14999,27 |
| | | 7701,29 | | | 50189,19 | | |
| | 2 | 13271,70 | | | 72571,97 | | |

| | | |
|---|----------|----------|
| | 12075,96 | 83729,40 |
| | 11288,30 | 56655,46 |
| | 14881,98 | 92631,86 |
| | 7900,50 | 54510,28 |
| 3 | 7488,58 | 46418,68 |
| | 8418,11 | 41552,81 |
| | 9835,88 | 45119,94 |

Tabelle 16: Induktionsfaktoren der Kotransformation von NF-κB p65 mit den Tetrameren der *cis*-Sequenzen 15 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (Werte aus Tabelle 15 und Abbildung 20)

| Konstrukte | Induktionsfaktor | Mittelwert | Std.abw. | t-Test |
|------------|------------------|------------|----------|--------|
| | 10,27 | | | |
| | 9,41 | | | |
| | 10,09 | | | |
| | 13,24 | | | |
| | 8,62 | | | |
| | 8,24 | | | |
| | 8,52 | | | |
| | 8,76 | | | |
| | 7,52 | | | |
| | 8,53 | | | |
| | 8,05 | | | |
| S15 | 7,24 | 10,92 | 2,85 | |
| | 11,60 | | | |
| | 15,45 | | | |
| | 13,07 | | | |
| | 14,20 | | | |
| | 11,47 | | | |
| | 14,00 | | | |
| | 13,07 | | | |
| | 14,77 | | | |
| | 9,69 | | | |
| | 18,02 | | | |
| | 9,75 | | | |
| | 8,58 | | | |
| | 2,07 | | | |
| | 1,93 | | | |
| | 2,39 | | | |
| | 3,56 | | | |
| | 1,84 | | | |
| S15mut12 | 2,20 | 2,59 | 0,57 | 0,0000 |
| | 3,12 | | | |
| | 2,80 | | | |
| | 2,99 | | | |
| | 2,28 | | | |
| | 3,53 | | | |

| | | | | |
|---------|-------|-------|------|--------|
| | 2,32 | | | |
| | 15,91 | | | |
| | 10,93 | | | |
| | 18,25 | | | |
| | 13,84 | | | |
| | 18,94 | | | |
| S15mut5 | 33,75 | 16,42 | 6,69 | 0,0216 |
| | 18,40 | | | |
| | 22,07 | | | |
| | 14,93 | | | |
| | 13,23 | | | |
| | 5,91 | | | |
| | 10,82 | | | |
| | 2,71 | | | |
| | 2,81 | | | |
| | 2,15 | | | |
| | 3,15 | | | |
| | 1,75 | | | |
| S15mut4 | 1,91 | 2,24 | 0,41 | 0,0000 |
| | 1,90 | | | |
| | 2,35 | | | |
| | 2,03 | | | |
| | 2,12 | | | |
| | 1,91 | | | |
| | 2,11 | | | |
| | 7,24 | | | |
| | 8,28 | | | |
| | 10,06 | | | |
| | 6,52 | | | |
| | 5,47 | | | |
| S15mutd | 6,93 | 6,53 | 1,48 | 0,0000 |
| | 5,02 | | | |
| | 6,22 | | | |
| | 6,90 | | | |
| | 6,20 | | | |
| | 4,94 | | | |
| | 4,59 | | | |

Tabelle 17: Normierte GUS-Werte nach Pep25-Behandlung der Transformation der Tetramere der *cis*-Sequenzen 18 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 21A)

| Konstrukte | Experiment | - Pep25 | Mittelwert | Std.abw. | + Pep25 | Mittelwert | Std.abw. | t-Test |
|------------|------------|---------|------------|----------|---------|------------|----------|--------|
| pBT10 | 1 | 3234,56 | 1811,60 | 843,03 | 3345,72 | 2159,63 | 1114,73 | 0,4654 |
| | | 2012,36 | | | 2133,46 | | | |
| | 2 | 2314,97 | | | 2235,41 | | | |
| | | 3093,78 | | | 4560,45 | | | |
| | | | | | | | | |

| | | | | | | | | |
|---------|---|----------------------|----------|----------|------------------------|-----------|----------|--------|
| | 3 | 1628,82 1592,63 | | | 1547,11 2700,67 | | | |
| | 4 | 1691,16 1263,25 | | | 2140,68 1450,36 | | | |
| | 5 | 560,95 723,55 | | | 576,97 905,43 | | | |
| D | 1 | 15597,02 25780,45 | | | 146401,47 123304,97 | | | |
| | 2 | 18471,38 46895,53 | | | 88037,50 81781,49 | | | |
| | 3 | 19070,69 | 23348,81 | 12337,98 | 155105,65 147617,00 | 106344,06 | 32199,79 | 0,0000 |
| | 4 | 13204,05 14332,49 | | | 93430,12 79743,94 | | | |
| | 5 | 43762,19 13025,46 | | | 58341,15 89677,27 | | | |
| S18 | 1 | 28777,10 16310,85 | | | 64525,87 42619,97 | | | |
| | 2 | 10505,87 10717,20 | | | 12919,72 16541,99 | | | |
| | 3 | 22134,56 13199,52 | 13679,23 | 6632,31 | 30650,82 43750,33 | 28295,96 | 16495,54 | 0,0299 |
| | 4 | 9367,27 9716,26 | | | 21677,64 26417,30 | | | |
| | 5 | 10891,44 5172,29 | | | 12678,07 11177,93 | | | |
| S18mut1 | 1 | 7565,36 5142,10 | | | 10936,24 9599,18 | | | |
| | 2 | 7244,34 5272,31 | | | 6888,94 7076,78 | | | |
| | 3 | 7523,00 4490,82 | 5078,94 | 1739,01 | 13628,32 9008,26 | 7534,76 | 3097,00 | 0,0568 |
| | 4 | 4112,87 3811,70 | | | 5967,01 4757,04 | | | |
| | 5 | 2492,86 3134,04 | | | 2961,06 4524,73 | | | |
| S18mut2 | 1 | 11954,49 9777,43 | | | 13193,63 11754,75 | | | |
| | 2 | 10142,24 10503,39 | | | 12177,24 10130,26 | | | |
| | 3 | 10088,27 17444,34 | 9484,08 | 3402,10 | 16204,27 21525,83 | 12938,68 | 4748,86 | 0,0947 |
| | 4 | 5416,59 6951,20 | | | 19024,79 13207,83 | | | |
| | 5 | 6943,68 5619,17 | | | 5864,92 6303,29 | | | |

Tabelle 18: Normierte GUS-Werte nach Pep25-Behandlung der Transformation der Tetramere der *cis*-Sequenzen 18 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 21B)

| Konstrukte | Experiment | - Pep25 | Mittelwert | Std.abw. | + Pep25 | Mittelwert | Std.abw. | t-Test |
|------------|------------|----------|------------|----------|-----------|------------|----------|--------|
| pBT10 | 1 | 1445,58 | 2166,53 | 1145,34 | 813,87 | 2575,69 | 1483,78 | 0,2620 |
| | | 880,90 | | | 851,16 | | | |
| | 2 | 667,88 | | | 1056,29 | | | |
| | | 1317,58 | | | 2469,87 | | | |
| | 3 | 328,20 | | | 921,86 | | | |
| | | 1009,86 | | | 1424,10 | | | |
| | 4 | 3150,11 | | | 3862,53 | | | |
| | | 3948,15 | | | 3667,62 | | | |
| | 5 | 2678,80 | | | 4146,47 | | | |
| | | 2300,00 | | | 2853,24 | | | |
| | 6 | 3215,18 | | | 4901,33 | | | |
| | | 2631,92 | | | 2991,24 | | | |
| | 7 | 2159,97 | | | 2183,06 | | | |
| | | 1888,86 | | | 1674,55 | | | |
| | 8 | 4375,78 | | | 5328,02 | | | |
| | | 4645,32 | | | 5485,81 | | | |
| | 9 | 2417,33 | | | 3581,46 | | | |
| | | 2105,81 | | | 1353,58 | | | |
| | 10 | 4018,26 | | | 4458,67 | | | |
| | | 3610,92 | | | 4855,44 | | | |
| | 11 | 1333,48 | | | 1256,34 | | | |
| | | 1180,58 | | | 986,26 | | | |
| | 12 | 1437,88 | | | 1166,44 | | | |
| | | 1232,56 | | | 1025,23 | | | |
| | 13 | 1534,06 | | | 1622,48 | | | |
| | | 2056,23 | | | 2536,26 | | | |
| | 14 | 1229,77 | | | 1963,07 | | | |
| | | 1861,92 | | | 2682,99 | | | |
| D | 1 | 7905,39 | 16252,35 | 8432,76 | 40341,43 | 125013,95 | 68582,77 | 0,0000 |
| | | 11185,25 | | | 37600,79 | | | |
| | 2 | 5951,96 | | | 69546,16 | | | |
| | | 5876,40 | | | 83031,64 | | | |
| | 3 | 8616,58 | | | 79584,87 | | | |
| | | 8972,57 | | | 94021,03 | | | |
| | 4 | 30430,05 | | | 274397,60 | | | |
| | | 24337,70 | | | 260748,35 | | | |
| | 5 | 25234,30 | | | 118647,72 | | | |
| | | 34443,76 | | | 243182,54 | | | |
| | 6 | 17710,44 | | | 237926,21 | | | |
| | | 15648,66 | | | 150821,81 | | | |
| | 7 | 15648,66 | | | 150821,81 | | | |
| | | 15648,66 | | | 150821,81 | | | |
| | 8 | 29082,61 | | | 157052,59 | | | |
| | | 29082,61 | | | 157052,59 | | | |

| | | | | | | | | |
|---------|----|----------|----------|---------|-----------|----------|----------|--------|
| | | 24489,19 | | | 126138,04 | | | |
| | 9 | 12411,08 | | | 151685,45 | | | |
| | | 7370,93 | | | 58655,47 | | | |
| | 10 | 9854,99 | | | 84708,04 | | | |
| | | | | | 89795,58 | | | |
| | 11 | 13139,48 | | | 92109,17 | | | |
| | | 13032,87 | | | 80311,29 | | | |
| | 12 | 18339,82 | | | 117311,58 | | | |
| | | 17265,31 | | | 102689,54 | | | |
| S18 | 1 | 6569,27 | | | 18880,67 | | | |
| | | 9762,27 | | | 14337,31 | | | |
| | 2 | 7405,67 | | | 8712,66 | | | |
| | | 11151,41 | | | 5230,78 | | | |
| | 3 | 19157,53 | | | 34105,61 | | | |
| | | 16523,89 | | | 29957,08 | | | |
| | 4 | 14956,26 | | | 34964,71 | | | |
| | | 13578,30 | | | 49128,37 | | | |
| | 5 | 23740,42 | | | 70650,81 | | | |
| | | 16378,65 | | | 34933,09 | | | |
| | 6 | 14484,73 | | | 32189,05 | | | |
| | | 9709,37 | | | 30063,79 | | | |
| | 7 | 16107,07 | 11389,13 | 5067,40 | 50641,14 | 24189,93 | 15819,60 | 0,0006 |
| | | 22094,17 | | | 44811,63 | | | |
| | 8 | 8236,14 | | | 13563,00 | | | |
| | | 10420,68 | | | 18212,56 | | | |
| | 9 | 10604,41 | | | 15104,87 | | | |
| | | 7372,42 | | | 11006,91 | | | |
| | 10 | 6436,35 | | | 13246,82 | | | |
| | | 7535,24 | | | 15887,30 | | | |
| | 11 | 8771,41 | | | 12892,32 | | | |
| | | 4931,11 | | | 4362,23 | | | |
| | 12 | 11108,24 | | | 19469,19 | | | |
| | | 7521,66 | | | 20687,49 | | | |
| | 13 | 6609,76 | | | 15571,74 | | | |
| | | 4950,97 | | | 10327,17 | | | |
| S18mut4 | 1 | 5355,09 | | | 8832,13 | | | |
| | | 4513,17 | | | 9954,94 | | | |
| | 2 | 5318,89 | 5264,02 | 735,64 | 12201,44 | 10070,40 | 1204,72 | 0,0001 |
| | | 4163,66 | | | 10001,39 | | | |
| | 3 | 6056,57 | | | 10803,57 | | | |
| | | 6176,72 | | | 8628,93 | | | |
| S18mut5 | 1 | 1176,52 | | | 602,67 | | | |
| | | 1572,60 | | | 1269,80 | | | |
| | 2 | 1635,01 | 1692,65 | 436,14 | 3737,06 | 2273,36 | 1070,11 | 0,2155 |
| | | 2054,33 | | | 2666,45 | | | |
| | 3 | 959,94 | | | 1222,50 | | | |
| | | 1717,99 | | | 2197,62 | | | |

| | | | | | | | | |
|----------|---|----------------------------------|----------|---------|----------------------------------|----------|----------|--------|
| | 4 | 2091,93 2332,84 | | | 3427,04 3063,78 | | | |
| | 1 | 2054,56 1421,41 | | | 1387,70 672,83 | | | |
| S18mut6 | 2 | 4301,54 3762,99 | 4673,32 | 3170,34 | 7266,76 4069,07 | 5753,87 | 5859,59 | 0,7166 |
| | 3 | 3179,80 2815,76 | | | 2931,92 5720,97 | | | |
| | 4 | 9162,96 10687,52 | | | 8554,67 12191,45 | | | |
| | 1 | 7702,15 9124,80 | | | 24736,60 9659,55 | | | |
| S18mut7 | 2 | 8693,78 7088,15 | 7784,66 | 954,77 | 14038,84 17601,58 | 14291,59 | 5494,48 | 0,0451 |
| | 3 | 6251,32 7847,78 | | | 9523,36 10189,65 | | | |
| | 1 | 17074,19 19880,49 | | | 89978,50 94269,83 | | | |
| S18mut8 | 2 | 14669,02 14624,22 | 16841,52 | 1919,66 | 72572,88 100089,56 | 96196,04 | 12991,63 | 0,0000 |
| | 3 | 16269,29 18531,88 | | | 108052,94 112212,51 | | | |
| | 1 | 29366,67 43599,83 | | | 68674,09 71788,06 | | | |
| S18mut3 | 2 | 33653,62 | 31722,01 | 6586,73 | 69461,17 | 60960,47 | 11982,85 | 0,0048 |
| | 3 | 25300,19 26689,74 | | | 40252,29 54626,73 | | | |
| | 1 | 4894,77 3531,95 8318,53 | | | 6215,17 4122,94 10207,51 | | | |
| | 2 | 4285,77 2110,45 2300,44 | 3886,08 | 1963,71 | 3831,62 1940,73 2039,05 | 4046,20 | 2315,98 | 0,8628 |
| S18mut9 | 3 | 2512,67 2289,31 3212,39 | | | 2833,48 1858,58 3843,47 | | | |
| | 4 | 2975,98 2756,19 7444,59 | | | 2814,91 2828,61 6018,33 | | | |
| | 1 | 11782,01 8526,87 | | | 18772,99 12792,30 | | | |
| S18mut10 | 2 | 14805,26 11141,02 14514,71 | 11963,84 | 2488,65 | 27979,19 18139,78 25553,93 | 23296,87 | 6252,73 | 0,0035 |
| | 3 | 14299,06 8677,96 | | | 30791,70 29048,24 | | | |
| S18mut11 | 1 | 8671,16 | 11489,98 | 2536,26 | 42133,13 | 40209,29 | 17468,80 | 0,0032 |

| | | | |
|--|---|----------|----------|
| | | 10297,14 | 20176,10 |
| | | 9835,26 | 27185,09 |
| | 2 | 12065,49 | 26927,41 |
| | | 9591,41 | 34483,69 |
| | | 10389,81 | 45092,53 |
| | | 14672,59 | 45381,88 |
| | 3 | 16397,02 | 80294,46 |

Tabelle 19: Normierte GUS-Werte nach Pep25-Behandlung der Transformation der Tetramere der *cis*-Sequenzen 18 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 36)

| Konstrukte | Experiment | - Pep25 | Mittelwert | Std.abw. | + Pep25 | Mittelwert | Std.abw. | t-Test |
|------------|------------|----------|------------|----------|-----------|------------|----------|--------|
| pBT10 | 1 | 2016,90 | 2027,20 | 577,26 | 1282,67 | 1897,60 | 498,96 | 0,7122 |
| | | 2698,67 | | | 2352,26 | | | |
| | 2 | 2118,78 | | | 2512,60 | | | |
| | | 2718,02 | | | 2295,08 | | | |
| | 3 | 1407,38 | | | 1540,66 | | | |
| | | 1203,43 | | | 1402,33 | | | |
| D | 1 | 14114,96 | 22622,35 | 9089,12 | 123023,71 | 110429,53 | 33937,38 | 0,0172 |
| | | 37889,53 | | | 60547,56 | | | |
| | 2 | 18208,41 | | | 154222,67 | | | |
| | | 20276,49 | | | 103924,17 | | | |
| S18 | 1 | 10362,80 | 12308,43 | 2132,18 | 19082,80 | 20919,46 | 3328,11 | 0,0035 |
| | | 16083,29 | | | 26901,08 | | | |
| | 2 | 12503,69 | | | 16993,03 | | | |
| | | 12438,23 | | | 20182,64 | | | |
| S18mut8 | 1 | 9313,80 | 12236,78 | 6607,42 | 47523,45 | 52786,13 | 15398,09 | 0,0011 |
| | | 13089,97 | | | 70440,83 | | | |
| | 2 | 24857,71 | | | 75365,99 | | | |
| | | 14612,14 | | | 47428,42 | | | |
| S18mut23 | 1 | 4324,71 | 4125,61 | 1304,34 | 30693,19 | 5742,76 | 1649,30 | 0,1178 |
| | | 7222,32 | | | 45264,92 | | | |
| | 2 | 4929,18 | | | 6686,26 | | | |
| | | 3700,72 | | | 4227,40 | | | |
| S18mut24 | 1 | 5829,25 | 19215,84 | 3409,38 | 8129,13 | 110709,56 | 31922,88 | 0,0044 |
| | | 5229,47 | | | 6942,60 | | | |
| | 2 | 2836,44 | | | 5089,17 | | | |
| | | 2228,59 | | | 3382,01 | | | |
| S18mut24 | 1 | 20999,95 | 19215,84 | 3409,38 | 108009,29 | 110709,56 | 31922,88 | 0,0044 |
| | | 23657,89 | | | 162801,50 | | | |
| | 2 | 17733,03 | | | 82584,67 | | | |
| | | 13545,97 | | | 74024,84 | | | |
| | 3 | 20142,36 | | | 126127,50 | | | |

Tabelle 20: Normierte GUS-Werte nach Pep25-Behandlung der Transformation der Tetramere der *cis*-Sequenzen 18 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 37; in Zusammenarbeit mit Laureen Arndt gemessen)

| Konstrukte | Experiment | - Pep25 | Mittelwert | Std.abw. | + Pep25 | Mittelwert | Std.abw. | t-Test |
|------------|------------|----------|------------|----------|-----------|------------|----------|--------|
| pBT10 | 1 | 2803,87 | 2022,89 | 663,91 | 1773,91 | 1421,95 | 354,14 | 0,2302 |
| | 2 | 2152,23 | | | 834,80 | | | |
| | 3 | 2168,60 | | | 1487,62 | | | |
| | 4 | 966,84 | | | 1591,46 | | | |
| D | 1 | 11082,77 | 26678,15 | 24369,13 | 124203,74 | 110435,74 | 20583,24 | 0,0216 |
| | 2 | 61091,06 | | | 81340,57 | | | |
| | 3 | 7860,63 | | | 125762,91 | | | |
| S18mut8 | 1 | 18303,70 | 11286,60 | 3606,04 | 40102,19 | 34363,38 | 7361,36 | 0,0003 |
| | | 10462,53 | | | 27850,93 | | | |
| | 2 | 10643,76 | | | 32243,90 | | | |
| | | 9251,42 | | | 29161,96 | | | |
| S18mut19 | 3 | 12476,08 | 6345,71 | 1702,46 | 48040,91 | 10929,46 | 2667,99 | 0,0110 |
| | | 6582,12 | | | 28780,41 | | | |
| | 1 | 5165,92 | | | 10247,18 | | | |
| | | 8844,67 | | | 14579,73 | | | |
| S18mut20 | 2 | 8435,83 | 1243,64 | 208,31 | 7635,34 | 1414,53 | 364,98 | 0,3048 |
| | | 5716,94 | | | 9761,72 | | | |
| | 3 | 4205,78 | | | 8884,59 | | | |
| | | 5705,12 | | | 14468,22 | | | |
| S18mut21 | 1 | 1582,69 | 2445,76 | 588,57 | 1168,21 | 2441,41 | 806,59 | 0,9910 |
| | | 1452,85 | | | 2013,19 | | | |
| | 2 | 1089,25 | | | 1542,01 | | | |
| | | 1313,68 | | | 1474,27 | | | |
| S18mut22 | 3 | 1171,93 | 4385,44 | 1002,81 | 836,80 | 8352,22 | 3274,42 | 0,0148 |
| | | 1361,07 | | | 1734,90 | | | |
| | 4 | 914,98 | | | 1547,82 | | | |
| | | 1062,69 | | | 999,02 | | | |
| S18mut21 | 1 | 2972,14 | 2445,76 | 588,57 | 2926,94 | 2441,41 | 806,59 | 0,9910 |
| | | 2843,35 | | | 1182,72 | | | |
| | 2 | 2267,37 | | | 2242,88 | | | |
| | | 2975,05 | | | 3331,05 | | | |
| S18mut22 | 3 | 2363,76 | 4385,44 | 1002,81 | 2283,65 | 8352,22 | 3274,42 | 0,0148 |
| | | 3054,40 | | | 3616,59 | | | |
| | 4 | 1434,76 | | | 1377,75 | | | |
| | | 1655,26 | | | 2569,72 | | | |
| S18mut22 | 1 | 5951,43 | 4385,44 | 1002,81 | 14200,11 | 8352,22 | 3274,42 | 0,0148 |
| | | 5951,83 | | | 10310,70 | | | |
| | 2 | 4590,35 | | | 9168,55 | | | |
| | | 3766,66 | | | 5253,29 | | | |
| S18mut22 | 3 | 3117,49 | 4385,44 | 1002,81 | 5203,78 | 8352,22 | 3274,42 | 0,0148 |
| | | 4272,54 | | | 11047,06 | | | |
| | 4 | 4032,10 | | | 7746,32 | | | |
| | | 3401,12 | | | 3887,97 | | | |

Tabelle 21: Normierte GUS-Werte der Kotreformation von NF- κ B p65 mit den Tetrameren der *cis*-Sequenzen 18 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 22A; Werte in Zusammenarbeit mit Marcel Staar (2017) gemessen)

| Konstrukte | Experiment | pORE | Mittelwert | Std.abw. | p65-pORE | Mittelwert | Std.abw. |
|------------|------------|----------|------------|----------|-----------|------------|----------|
| pBT10 | 1 | 3873,71 | 2076,90 | 813,58 | 10180,13 | 8136,72 | 2620,58 |
| | | 2654,09 | | | 8468,02 | | |
| | | 2092,23 | | | 8211,77 | | |
| | | 1658,98 | | | 6126,17 | | |
| | 2 | 11232,90 | | | 11103,03 | | |
| | | 2160,38 | | | 13319,41 | | |
| | | 3158,58 | | | 6881,68 | | |
| | | 1962,02 | | | 5681,13 | | |
| | 3 | 1341,05 | | | 5535,90 | | |
| | | 1174,41 | | | 5334,72 | | |
| | | 1241,32 | | | 5565,80 | | |
| | | 1529,15 | | | | | |
| S18 | 1 | 8042,97 | 11095,61 | 4186,02 | 74844,66 | 62971,54 | 17607,06 |
| | | 9123,93 | | | 46890,68 | | |
| | | 8079,36 | | | 55238,93 | | |
| | | 6763,96 | | | 53605,61 | | |
| | 2 | 6616,56 | | | 64707,09 | | |
| | | 6202,74 | | | 60827,34 | | |
| | | 6675,47 | | | 89675,49 | | |
| | | 6285,29 | | | 56608,38 | | |
| | 3 | 13001,27 | | | 79204,01 | | |
| | | 12278,21 | | | 95681,92 | | |
| | | 13011,68 | | | 62393,23 | | |
| | | 15392,77 | | | 103555,64 | | |
| | 4 | 12851,32 | | | 78895,54 | | |
| | | 12260,34 | | | 60572,11 | | |
| | | 16023,45 | | | 74236,46 | | |
| | | 12136,18 | | | 75084,36 | | |
| | 5 | 22447,72 | | | 67056,38 | | |
| | | 16384,24 | | | 43944,39 | | |
| | | 14773,61 | | | 42390,23 | | |
| | | 15475,48 | | | 39919,81 | | |
| | 6 | 10260,04 | | | 56268,04 | | |
| | | 7604,99 | | | 41359,38 | | |
| | | 5784,30 | | | 38431,75 | | |
| | | 8818,85 | | | 49925,52 | | |
| S18mut1 | 1 | 3076,83 | 5296,98 | 2393,19 | 19903,28 | 23475,28 | 7903,24 |
| | | 3875,66 | | | 22059,77 | | |
| | | 4296,26 | | | 16020,73 | | |
| | | 3881,88 | | | 14634,35 | | |
| | 2 | 4620,24 | | | 24755,64 | | |
| | | 4484,79 | | | 14668,39 | | |
| | | 4091,08 | | | 30355,48 | | |
| | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|---------|---|----------|---------|---------|----------|----------|---------|
| | | 3319,70 | | | 17336,61 | | |
| | | 6004,91 | | | 19273,15 | | |
| | 3 | 5607,21 | | | 25180,23 | | |
| | | 4715,45 | | | 22184,15 | | |
| | | 5622,07 | | | 24691,10 | | |
| | | 14350,70 | | | 34480,05 | | |
| | 4 | 8563,05 | | | 31154,33 | | |
| | | 6294,59 | | | 48353,00 | | |
| | | 4569,16 | | | 20091,75 | | |
| | | 5007,87 | | | 16037,02 | | |
| | 5 | 3775,63 | | | 19793,45 | | |
| | | 4589,81 | | | 28281,43 | | |
| | | 5192,73 | | | 20251,64 | | |
| | | 5674,02 | | | 17869,28 | | |
| | 1 | 5800,45 | | | 17166,94 | | |
| | | | | | 24520,23 | | |
| | | | | | 22725,62 | | |
| | | 5698,17 | | | 28298,26 | | |
| S18mut2 | 2 | 8052,23 | 7047,66 | 1571,06 | 20202,33 | 26764,66 | 7255,55 |
| | | 4902,49 | | | 28360,16 | | |
| | | 5689,57 | | | 20444,17 | | |
| | | 7849,86 | | | 41427,51 | | |
| | 3 | 8751,20 | | | 31663,63 | | |
| | | 8498,19 | | | 34551,55 | | |
| | | 9560,43 | | | 33946,21 | | |

Tabelle 22: Induktionsfaktoren der Kotransformation von NF- κ B p65 mit den Tetrameren der *cis*-Sequenzen 18 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (Werte aus Tabelle 21 und Abbildung 22B; Werte in Zusammenarbeit mit Marcel Staar (2017) gemessen)

| Konstrukte | Induktionsfaktor | Mittelwert | Std.abw. | t-Test |
|------------|------------------|------------|----------|--------|
| | 2,63 | | | |
| | 3,19 | | | |
| | 3,92 | | | |
| | 3,69 | | | |
| | 5,14 | | | |
| pBT10 | 4,22 | 3,93 | 0,67 | 0,0002 |
| | 3,51 | | | |
| | 4,24 | | | |
| | 4,71 | | | |
| | 4,30 | | | |
| | 3,64 | | | |
| | 9,31 | | | |
| | 5,14 | | | |
| S18 | 6,84 | 6,37 | 2,56 | |
| | 7,93 | | | |
| | 9,78 | | | |
| | 9,81 | | | |

| | | | | |
|---------|-------|------|------|--------|
| | 13,43 | | | |
| | 9,01 | | | |
| | 6,09 | | | |
| | 7,79 | | | |
| | 4,80 | | | |
| | 6,73 | | | |
| | 6,14 | | | |
| | 4,94 | | | |
| | 4,63 | | | |
| | 6,19 | | | |
| | 2,99 | | | |
| | 2,68 | | | |
| | 2,87 | | | |
| | 2,58 | | | |
| | 5,48 | | | |
| | 5,44 | | | |
| | 6,64 | | | |
| | 5,66 | | | |
| | 6,47 | | | |
| | 5,69 | | | |
| | 3,73 | | | |
| | 3,77 | | | |
| | 5,36 | | | |
| | 3,27 | | | |
| | 7,42 | | | |
| | 5,22 | | | |
| | 3,21 | | | |
| S18mut1 | 4,49 | 4,72 | 1,40 | 0,0116 |
| | 4,70 | | | |
| | 4,39 | | | |
| | 2,40 | | | |
| | 3,64 | | | |
| | 7,68 | | | |
| | 4,40 | | | |
| | 3,20 | | | |
| | 5,24 | | | |
| | 6,16 | | | |
| | 3,90 | | | |
| | 3,15 | | | |
| | 2,96 | | | |
| | 4,97 | | | |
| | 2,51 | | | |
| S18mut2 | 5,78 | 3,95 | 1,01 | 0,0005 |
| | 3,59 | | | |
| | 5,28 | | | |
| | 3,62 | | | |
| | 4,07 | | | |

3,55

Tabelle 23: Normierte GUS-Werte der Kotreformation von NF- κ B p65 mit den Tetrameren der *cis*-Sequenzen 18 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 22C; Werte in Zusammenarbeit mit Marcel Staar (2017) gemessen)

| Konstrukte | Experiment | pORE | Mittelwert | Std.abw. | p65-pORE | Mittelwert | Std.abw. |
|------------|------------|----------|------------|----------|-----------|------------|----------|
| pBT10 | 1 | 2976,80 | 2317,09 | 436,30 | 8687,69 | 8226,49 | 1220,58 |
| | | 2024,93 | | | | | |
| | 2 | 2116,26 | | | 9256,59 | | |
| | | 2089,16 | | | 9212,90 | | |
| | 3 | 2861,22 | | | 5955,00 | | |
| | | 1834,14 | | | 8020,26 | | |
| S18 | 1 | 8223,51 | 10046,73 | 3139,69 | 90587,15 | 75333,54 | 24119,61 |
| | | 11137,53 | | | 88528,25 | | |
| | | 9159,72 | | | 94064,53 | | |
| | | 11793,56 | | | 80824,79 | | |
| | 2 | 9080,47 | | | 97126,99 | | |
| | | 7133,49 | | | 133595,94 | | |
| | | 7858,08 | | | | | |
| | | 7444,98 | | | | | |
| | 3 | 14175,80 | | | 85666,46 | | |
| | | 18248,80 | | | 80744,34 | | |
| | 4 | 11014,62 | | | 46855,05 | | |
| | | 9642,01 | | | 56777,99 | | |
| | 5 | 7794,42 | | | 86927,21 | | |
| | | 8083,61 | | | 34881,45 | | |
| | | | | | 92070,89 | | |
| | | | | | 51807,41 | | |
| | 6 | 7554,65 | | | 58219,26 | | |
| | | 5916,61 | | | 53814,08 | | |
| | | 8766,57 | | | 99100,27 | | |
| | | 7644,64 | | | 50302,86 | | |
| | 7 | 14045,54 | | | 107715,81 | | |
| | | 9023,95 | | | 61912,00 | | |
| | | 9478,84 | | | 47267,24 | | |
| | | 18887,82 | | | 58547,92 | | |
| | 8 | 8509,48 | | | | | |
| | | 9064,59 | | | | | |
| | | 11778,87 | | | | | |
| | | 9752,69 | | | | | |
| S18mut4 | 1 | 14286,14 | 6239,27 | 2646,37 | 11971,27 | 11956,92 | 3753,72 |
| | | 9541,73 | | | 12954,06 | | |
| | | 10764,33 | | | 9955,61 | | |
| | | 6093,20 | | | 13862,05 | | |
| | 2 | 5446,78 | | | 9038,39 | | |
| | | 4991,59 | | | 7061,42 | | |

| | | | | | | | |
|---------|---|---------|---------|---------|----------|----------|----------|
| | | 5153,67 | | | 12464,89 | | |
| | | 4944,47 | | | 7515,53 | | |
| | 3 | 3301,68 | | | 11820,86 | | |
| | | 3721,86 | | | 10079,42 | | |
| | | 4137,95 | | | 9974,89 | | |
| | | 2835,73 | | | 9025,08 | | |
| | 4 | 4972,24 | | | 14340,56 | | |
| | | 4769,91 | | | 9146,43 | | |
| | | 5600,46 | | | 9104,01 | | |
| | | 3924,64 | | | 7709,25 | | |
| | 5 | 5734,82 | | | 20181,50 | | |
| | | 4474,12 | | | 17286,90 | | |
| | | 4942,19 | | | 17778,62 | | |
| | | 6206,47 | | | 17867,66 | | |
| | 6 | 9211,19 | | | | | |
| | | 7590,88 | | | | | |
| | | 8620,66 | | | | | |
| | | 8475,85 | | | | | |
| | 1 | 5848,29 | | | 42292,97 | | |
| | | 2476,76 | | | 47950,94 | | |
| | | 4074,81 | | | 47082,42 | | |
| | | 2629,24 | | | | | |
| S18mut9 | 2 | 3284,61 | | | 68146,34 | | |
| | | 3877,22 | 3254,57 | 924,60 | 53463,78 | 58308,08 | 13070,19 |
| | | 2476,95 | | | 92414,04 | | |
| | | 2742,76 | | | 52312,86 | | |
| | 3 | 2669,09 | | | 53042,16 | | |
| | | 3165,90 | | | 58991,49 | | |
| | | 2828,77 | | | 62316,90 | | |
| | | 2980,41 | | | 63374,94 | | |
| | 1 | 2659,40 | | | 42979,65 | | |
| | | 1423,12 | | | 28535,65 | | |
| | | 2340,95 | | | 24760,71 | | |
| | | 2330,62 | | | 30811,26 | | |
| | 2 | 2401,90 | | | 12905,50 | | |
| | | 1878,56 | | | 8286,29 | | |
| | | 2082,23 | | | 11300,21 | | |
| S18mut5 | | 1949,67 | 2362,10 | 586,09 | 12193,53 | 23338,80 | 12350,79 |
| | | 4168,49 | | | 35969,02 | | |
| | 3 | 2351,21 | | | 47107,18 | | |
| | | 2040,05 | | | 31150,25 | | |
| | | 2025,51 | | | 34409,53 | | |
| | 4 | 2921,89 | | | 18112,19 | | |
| | | 2601,28 | | | 15128,39 | | |
| | | 2612,95 | | | 10489,26 | | |
| | | 2005,70 | | | 9282,23 | | |
| S18mut6 | 1 | 5207,09 | 3485,92 | 2073,36 | 17274,17 | 11242,58 | 4667,96 |

| | | | | | | | |
|---------|---|----------|----------|---------|-----------|----------|----------|
| | | 6602,14 | | | 16244,88 | | |
| | | 7076,77 | | | 17140,34 | | |
| | | 6411,20 | | | 15475,39 | | |
| | | 2447,96 | | | 8751,26 | | |
| | 2 | 2169,94 | | | 8995,06 | | |
| | | 2640,66 | | | 10198,67 | | |
| | | 2493,87 | | | 16225,66 | | |
| | | 1575,53 | | | 6279,79 | | |
| | 3 | 1657,69 | | | 8169,02 | | |
| | | 1549,80 | | | 4829,75 | | |
| | | 1998,38 | | | 5326,91 | | |
| | | 6675,87 | | | 84182,86 | | |
| | 1 | 5920,92 | | | 48282,07 | | |
| | | 7208,15 | | | 131874,09 | | |
| | | 7742,42 | | | 110379,48 | | |
| | | 10019,48 | | | 146651,27 | | |
| | 2 | 7010,53 | | | 109220,48 | | |
| | | 6718,00 | | | 80204,57 | | |
| S18mut7 | | 7460,82 | 6747,06 | 1308,49 | 108477,20 | 91957,16 | 28681,66 |
| | | 5515,03 | | | 78184,03 | | |
| | 3 | 4523,29 | | | 77284,17 | | |
| | | 7234,60 | | | 51264,26 | | |
| | | 8406,52 | | | 77481,39 | | |
| | | 4984,43 | | | | | |
| | 4 | 6138,01 | | | | | |
| | | 6779,89 | | | | | |
| | | 5614,95 | | | | | |
| | | 26980,27 | | | 32879,51 | | |
| | 1 | 14209,23 | | | 25602,11 | | |
| | | 21091,58 | | | 45976,42 | | |
| | | 15156,31 | | | 34217,04 | | |
| | | 11318,19 | | | 32375,02 | | |
| S18mut8 | 2 | 10576,91 | 13921,48 | 5035,10 | 25681,42 | 32522,00 | 6111,49 |
| | | 8692,47 | | | 39663,54 | | |
| | | 9739,13 | | | 35810,07 | | |
| | | 13762,26 | | | 33153,10 | | |
| | 3 | 12970,27 | | | 33815,29 | | |
| | | 12505,32 | | | 27575,69 | | |
| | | 10055,77 | | | 23514,74 | | |

Tabelle 24: Induktionsfaktoren der Kotransformation von NF- κ B p65 mit den Tetrameren der *cis*-Sequenzen 18 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (Werte aus Tabelle 23 und Abbildung 22D; Werte in Zusammenarbeit mit Marcel Staar (2017) gemessen)

| Konstrukte | Induktionsfaktor | Mittelwert | Std.abw. | t-Test |
|------------|------------------|------------|----------|--------|
| pBT10 | 2,92 | 3,63 | 0,96 | 0,0001 |
| | 4,37 | | | |
| | 4,41 | | | |
| | 2,08 | | | |
| | 4,37 | | | |
| S18 | 11,02 | 7,94 | 3,50 | |
| | 7,95 | | | |
| | 10,27 | | | |
| | 6,85 | | | |
| | 10,70 | | | |
| | 18,73 | | | |
| | 6,04 | | | |
| | 4,42 | | | |
| | 4,25 | | | |
| | 5,89 | | | |
| | 11,15 | | | |
| | 4,32 | | | |
| | 7,71 | | | |
| | 9,10 | | | |
| | 11,30 | | | |
| | 6,58 | | | |
| | 7,67 | | | |
| S18mut4 | 6,86 | 2,33 | 0,90 | 0,0000 |
| | 4,99 | | | |
| | 3,10 | | | |
| | 0,84 | | | |
| | 1,36 | | | |
| | 0,92 | | | |
| | 2,28 | | | |
| | 1,66 | | | |
| | 1,41 | | | |
| | 2,42 | | | |
| | 1,52 | | | |
| | 3,58 | | | |
| | 2,71 | | | |
| | 2,41 | | | |
| | 3,18 | | | |
| | 2,88 | | | |
| | 1,92 | | | |
| | 1,63 | | | |
| | 1,96 | | | |
| | 3,52 | | | |
| | 3,86 | | | |

| | | | | |
|---------|-------|-------|------|--------|
| | 3,60 | | | |
| | 2,88 | | | |
| | 17,08 | | | |
| | 11,77 | | | |
| | 17,91 | | | |
| | 20,75 | | | |
| | 13,79 | | | |
| S18mut9 | 37,31 | 19,95 | 6,24 | 0,0001 |
| | 19,07 | | | |
| | 19,87 | | | |
| | 18,63 | | | |
| | 22,03 | | | |
| | 21,26 | | | |
| | 16,16 | | | |
| | 20,05 | | | |
| | 10,58 | | | |
| | 13,22 | | | |
| | 5,37 | | | |
| | 4,41 | | | |
| | 5,43 | | | |
| S18mut5 | 6,25 | 10,19 | 5,66 | 0,1907 |
| | 8,63 | | | |
| | 20,04 | | | |
| | 15,27 | | | |
| | 16,99 | | | |
| | 6,20 | | | |
| | 5,82 | | | |
| | 4,01 | | | |
| | 4,63 | | | |
| | 3,32 | | | |
| | 2,46 | | | |
| | 2,42 | | | |
| | 2,41 | | | |
| | 3,57 | | | |
| S18mut6 | 4,15 | 3,62 | 1,15 | 0,0000 |
| | 3,86 | | | |
| | 6,51 | | | |
| | 3,99 | | | |
| | 4,93 | | | |
| | 3,12 | | | |
| | 2,67 | | | |
| | 12,61 | | | |
| | 8,15 | | | |
| S18mut7 | 18,30 | 13,13 | 3,33 | 0,0005 |
| | 14,26 | | | |
| | 14,64 | | | |
| | 15,58 | | | |

| | | | | |
|---------|-------|------|------|--------|
| | 11,94 | | | |
| | 14,54 | | | |
| | 14,18 | | | |
| | 17,09 | | | |
| | 7,09 | | | |
| | 9,22 | | | |
| | 1,22 | | | |
| | 1,80 | | | |
| | 2,18 | | | |
| | 2,26 | | | |
| | 2,86 | | | |
| S18mut8 | 2,43 | 2,55 | 0,83 | 0,0000 |
| | 4,56 | | | |
| | 3,68 | | | |
| | 2,41 | | | |
| | 2,61 | | | |
| | 2,21 | | | |
| | 2,34 | | | |

Tabelle 25: Normierte GUS-Werte der Kotransformation von NF- κ B p65 mit den Tetrameren der *cis*-Sequenzen 24 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 23)

| Konstrukte | Experiment | pORE | Mittelwert | Std.abw. | p65-pORE | Mittelwert | Std.abw. |
|------------|------------|----------|------------|----------|-----------|------------|----------|
| S24 | 1 | 3158,84 | 2890,72 | 2187,93 | 52944,82 | 77931,79 | 26805,95 |
| | | 1738,64 | | | 52537,51 | | |
| | | 3473,82 | | | 96063,43 | | |
| | | 2869,55 | | | 53137,70 | | |
| | 2 | 3089,64 | | | 87165,58 | | |
| | | 11398,50 | | | 64680,16 | | |
| | | 2878,91 | | | 51506,09 | | |
| | | 2746,58 | | | 51887,50 | | |
| | 3 | 3159,16 | | | 122844,70 | | |
| | | 3292,13 | | | 83710,81 | | |
| | | 1360,82 | | | 72401,42 | | |
| | | 4654,75 | | | 125407,15 | | |
| | 4 | 2000,83 | | | 55684,15 | | |
| | | 1005,99 | | | 90298,21 | | |
| | | 2072,34 | | | 127008,96 | | |
| | | 1103,17 | | | 48293,67 | | |
| | 5 | 1758,76 | | | 93618,97 | | |
| | | 1957,97 | | | 72450,03 | | |
| | | 2129,10 | | | 139922,30 | | |
| | | 1197,64 | | | 60324,89 | | |
| | 6 | 1371,41 | | | 54199,17 | | |
| | | 1447,07 | | | 73432,56 | | |
| | | 2534,94 | | | 70521,15 | | |
| | | 6976,70 | | | 70321,92 | | |

| | | | | | | | |
|---------|---|---------|---------|---------|-----------|----------|----------|
| S24mut8 | 1 | 897,39 | 3147,09 | 2029,62 | 52501,28 | 70048,88 | 18997,12 |
| | | 1274,21 | | | 64236,52 | | |
| | | 3065,59 | | | 65777,10 | | |
| | | 1674,58 | | | 44713,38 | | |
| | 2 | 8382,03 | | | 85695,72 | | |
| | | 1632,03 | | | 83226,65 | | |
| | | 4173,37 | | | 62528,66 | | |
| | | 1560,58 | | | 76382,19 | | |
| | 3 | 2893,54 | | | 81486,77 | | |
| | | 5223,03 | | | 41294,09 | | |
| | | 4128,10 | | | 113128,51 | | |
| | | 2860,59 | | | 69615,63 | | |
| S24mut5 | 1 | 1752,81 | 1141,74 | 258,10 | 4507,04 | 4533,90 | 2047,06 |
| | | 853,51 | | | 3443,35 | | |
| | | 927,45 | | | 9624,96 | | |
| | | 957,53 | | | 4010,14 | | |
| | 2 | 1464,48 | | | 4060,56 | | |
| | | 1286,75 | | | 7451,56 | | |
| | | 1258,34 | | | 6097,43 | | |
| | | 989,41 | | | 3675,65 | | |
| | 3 | 1204,54 | | | 2672,54 | | |
| | | 989,76 | | | 2806,33 | | |
| | | 1146,64 | | | 2986,73 | | |
| | | 869,70 | | | 3070,56 | | |
| S24mut9 | 1 | 1106,33 | 2046,80 | 1322,67 | 19443,36 | 22569,74 | 3487,01 |
| | | 1126,31 | | | 19018,91 | | |
| | | 1431,50 | | | 17416,60 | | |
| | | 1127,66 | | | 19518,54 | | |
| | 2 | 1619,65 | | | 25482,91 | | |
| | | 1293,78 | | | 25060,59 | | |
| | | 1219,91 | | | 27197,99 | | |
| | | 1675,42 | | | 19080,02 | | |
| | 3 | 4568,02 | | | 23062,05 | | |
| | | 4674,25 | | | 22001,81 | | |
| | | 1132,27 | | | 25472,08 | | |
| | | 3586,56 | | | 28082,02 | | |
| S24mut4 | 1 | 1927,41 | 3916,96 | 1913,54 | 94881,08 | 85641,86 | 17578,31 |
| | | 2267,54 | | | 65461,95 | | |
| | | 8772,63 | | | 69004,93 | | |
| | | 2903,23 | | | 65193,80 | | |
| | 2 | 2235,81 | | | 83489,19 | | |
| | | 3651,93 | | | 94421,93 | | |
| | | 5020,40 | | | 99306,88 | | |
| | | 2632,02 | | | 77455,98 | | |
| | 3 | 3712,94 | | | 85718,96 | | |
| | | 6313,25 | | | 74571,67 | | |
| | | 3051,45 | | | 87165,50 | | |

4514,88

131030,40

Tabelle 26: Induktionsfaktoren der Kotransformation von NF- κ B p65 mit den Tetrameren der *cis*-Sequenzen 24 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (Werte aus Tabelle 25 und Abbildung 23)

| Konstrukte | Induktionsfaktor | Mittelwert | Std.abw. | t-Test |
|------------|------------------|------------|----------|--------|
| S24 | 16,76 | 36,06 | 19,25 | |
| | 30,22 | | | |
| | 27,65 | | | |
| | 18,52 | | | |
| | 28,21 | | | |
| | 5,67 | | | |
| | 17,89 | | | |
| | 18,89 | | | |
| | 38,89 | | | |
| | 25,43 | | | |
| | 53,20 | | | |
| | 26,94 | | | |
| | 27,83 | | | |
| | 89,76 | | | |
| | 61,29 | | | |
| | 43,78 | | | |
| | 53,23 | | | |
| | 37,00 | | | |
| | 65,72 | | | |
| | 50,37 | | | |
| | 39,52 | | | |
| | 50,75 | | | |
| | 27,82 | | | |
| | 10,08 | | | |
| S24mut8 | 58,50 | 17,48 | 16,46 | 0,4209 |
| | 50,41 | | | |
| | 21,46 | | | |
| | 26,70 | | | |
| | 10,22 | | | |
| | 51,00 | | | |
| | 14,98 | | | |
| | 48,94 | | | |
| | 28,16 | | | |
| | 7,91 | | | |
| | 27,40 | | | |
| | 24,34 | | | |
| S24mut5 | 2,57 | 9,26 | 2,14 | 0,0000 |
| | 4,03 | | | |
| | 10,38 | | | |
| | 4,19 | | | |
| | 2,77 | | | |

| | | | | |
|---------|-------|-------|-------|--------|
| | 5,79 | | | |
| | 4,85 | | | |
| | 3,71 | | | |
| | 2,22 | | | |
| | 2,84 | | | |
| | 2,60 | | | |
| | 3,53 | | | |
| | 17,57 | | | |
| | 16,89 | | | |
| | 12,17 | | | |
| | 17,31 | | | |
| | 15,73 | | | |
| S24mut9 | 19,37 | 20,25 | 5,90 | 0,0000 |
| | 22,30 | | | |
| | 11,39 | | | |
| | 5,05 | | | |
| | 4,71 | | | |
| | 22,50 | | | |
| | 7,83 | | | |
| | 49,23 | | | |
| | 28,87 | | | |
| | 7,87 | | | |
| | 22,46 | | | |
| | 37,34 | | | |
| S24mut4 | 25,86 | 26,11 | 10,38 | 0,0590 |
| | 19,78 | | | |
| | 29,43 | | | |
| | 23,09 | | | |
| | 11,81 | | | |
| | 28,57 | | | |
| | 29,02 | | | |

Tabelle 27: Normierte GUS-Werte nach Pep25-Behandlung der Transformation der Tetramere des PR1₆₅₀₋₆₀₀ Promotorfragments und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 24)

| Konstrukte | Experiment | - Pep25 | Mittelwert | Std.abw. | + Pep25 | Mittelwert | Std.abw. | t-Test |
|------------------------|------------|----------|------------|----------|----------|------------|----------|--------|
| pBT10 | 1 | 1525,78 | 1461,27 | 61,57 | 1076,77 | 899,64 | 264,00 | 0,0880 |
| | 2 | 1479,67 | | | 1095,71 | | | |
| | 3 | 1378,37 | | | 526,45 | | | |
| D | 1 | 31673,44 | 16246,83 | 10985,08 | 98328,24 | 78561,97 | 13977,30 | 0,0089 |
| | 2 | 6945,19 | | | 68543,69 | | | |
| | 3 | 10121,86 | | | 68813,99 | | | |
| PR1 ₆₅₀₋₆₀₀ | 1 | 2457,05 | 5371,25 | 3427,73 | 24060,43 | 20200,45 | 5005,08 | 0,0004 |
| | | 2809,76 | | | 18305,81 | | | |
| | 2 | 12652,62 | | | 23315,18 | | | |
| | | 4255,25 | | | 25349,30 | | | |

| | | | | | | | | |
|------|---|----------------------|---------|---------|----------------------|----------|---------|--------|
| | 3 | 4340,67 5712,19 | | | 19738,35 10433,66 | | | |
| | 1 | 830,47 935,61 | | | 6901,05 9495,69 | | | |
| LS7 | 2 | 1215,54 1306,14 | 1163,35 | 208,40 | 9656,91 11382,66 | 8805,72 | 2541,26 | 0,0011 |
| | 3 | 1409,31 1283,00 | | | 11222,49 4175,55 | | | |
| | 1 | 10184,04 11072,41 | | | 28427,87 26991,65 | | | |
| LS8 | 2 | 6406,45 | 8312,94 | 1936,68 | 11607,09 | 18962,00 | 7262,37 | 0,0405 |
| | 3 | 7333,62 6568,17 | | | 12456,11 15327,26 | | | |
| | 1 | 2182,80 2000,76 | | | 7418,55 7783,17 | | | |
| LS9 | 2 | 4062,97 2616,59 | 2574,64 | 717,12 | 7221,57 9492,55 | 8147,89 | 1615,18 | 0,0002 |
| | 3 | 1955,91 2628,80 | | | 6026,76 10944,77 | | | |
| | 1 | 833,92 849,93 | | | 1023,00 1183,28 | | | |
| LS10 | 2 | 1296,89 1745,38 | 1237,47 | 325,66 | 1458,79 2198,49 | 1295,90 | 439,64 | 0,8165 |
| | 3 | 1213,79 1484,90 | | | 947,35 964,48 | | | |

Tabelle 28: Normierte GUS-Werte der Kotransformation von NF- κ B p65 mit den Tetrameren des PR1₆₅₀₋₆₀₀ Promotorfragments und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 25; Werte in Zusammenarbeit mit Anika Möller (2016) gemessen)

| Konstrukte | Experiment | pORE | Mittelwert | Std.abw. | p65-pORE | Mittelwert | Std.abw. |
|------------------------|------------|--|------------|----------|--|------------|----------|
| | 1 | 6297,52 5812,48 5753,03 6547,29 | | | 20237,85 21267,23 | | |
| PR1 ₆₅₀₋₆₀₀ | 2 | 6105,39 5389,89 5429,04 5344,17 | 5041,96 | 1231,28 | 25938,37 18067,87 19931,46 19370,78 | 24773,66 | 5847,14 |
| | 3 | 4493,03 2992,74 2819,73 3519,22 | | | 25911,07 28458,90 31576,97 36976,10 | | |
| LS7 | 1 | 878,72 973,25 901,49 | 1298,40 | 488,02 | 12598,36 13892,65 10315,28 9761,88 | 12530,50 | 1946,97 |

| | | | | | | | |
|------|---|----------|---------|---------|----------|----------|---------|
| | | 1457,60 | | | 17181,33 | | |
| | 2 | 2539,32 | | | 13008,12 | | |
| | | | | | 13424,56 | | |
| | | | | | 10557,30 | | |
| | | 1140,28 | | | 12881,90 | | |
| | 3 | 1027,62 | | | 11325,44 | | |
| | | 1497,63 | | | 11512,83 | | |
| | | 1269,71 | | | 13906,40 | | |
| | | 8623,19 | | | 41813,26 | | |
| | 1 | 6977,20 | | | 37219,00 | | |
| | | 9184,28 | | | 42447,31 | | |
| | | 7196,64 | | | 34802,29 | | |
| LS8 | | 12146,30 | | | 48487,25 | | |
| | 2 | 10814,41 | 9091,21 | 3174,65 | 47598,78 | 42377,49 | 4780,35 |
| | | 15679,14 | | | 47970,11 | | |
| | | 13382,00 | | | 42997,68 | | |
| | | 5238,67 | | | 49108,21 | | |
| | 3 | 4795,51 | | | 39744,03 | | |
| | | 7953,58 | | | 36435,47 | | |
| | | 7103,57 | | | 39906,50 | | |
| | | 3477,45 | | | 11720,10 | | |
| | 1 | 4318,16 | | | 10911,84 | | |
| | | 5127,80 | | | 10769,64 | | |
| | | 5077,68 | | | 10472,18 | | |
| | | 5580,76 | | | | | |
| LS9 | 2 | 5489,01 | 4828,53 | 1534,04 | 13912,58 | 13075,23 | 2492,29 |
| | | 7756,19 | | | 18183,55 | | |
| | | 7454,73 | | | 14816,67 | | |
| | | 4459,96 | | | 16773,17 | | |
| | 3 | 3199,26 | | | 13305,29 | | |
| | | 2828,40 | | | 12216,32 | | |
| | | 3173,01 | | | 10746,17 | | |
| | | 2068,45 | | | 3021,60 | | |
| | 1 | 1552,16 | | | 3259,65 | | |
| | | 1599,41 | | | 3752,97 | | |
| | | 1433,80 | | | 3483,19 | | |
| | | 2314,79 | | | 4262,39 | | |
| LS10 | 2 | 2077,60 | 1802,83 | 421,21 | 4079,99 | 3967,16 | 675,91 |
| | | 2702,22 | | | 3885,84 | | |
| | | 2010,66 | | | 4648,70 | | |
| | | 1782,75 | | | 3465,75 | | |
| | 3 | 1546,72 | | | 3483,67 | | |
| | | 1260,66 | | | 4986,34 | | |
| | | 1284,73 | | | 5275,85 | | |

Tabelle 29: Induktionsfaktoren der Kotransformation von NF- κ B p65 mit den Tetrameren des PR₁₆₅₀₋₆₀₀ Promotorfragments und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (Werte aus Tabelle 28 und Abbildung 25; Werte in Zusammenarbeit mit Anika Möller (2016) gemessen)

| Konstrukte | Induktionsfaktor | Mittelwert | Std.abw. | t-Test |
|------------------------|------------------|------------|----------|--------|
| PR ₁₆₅₀₋₆₀₀ | 3,52 | 5,86 | 3,07 | |
| | 3,25 | | | |
| | 4,25 | | | |
| | 3,35 | | | |
| | 3,67 | | | |
| | 3,62 | | | |
| | 5,77 | | | |
| | 9,51 | | | |
| | 11,20 | | | |
| | 10,51 | | | |
| | | | | |
| LS7 | 15,81 | 10,59 | 2,71 | 0,0037 |
| | 10,60 | | | |
| | 10,83 | | | |
| | 11,79 | | | |
| | 5,29 | | | |
| | 11,30 | | | |
| | 11,02 | | | |
| | 7,69 | | | |
| | 10,95 | | | |
| | | | | |
| LS8 | 4,85 | 5,18 | 1,80 | 0,5646 |
| | 5,33 | | | |
| | 4,62 | | | |
| | 4,84 | | | |
| | 3,99 | | | |
| | 4,40 | | | |
| | 3,06 | | | |
| | 3,21 | | | |
| | 9,37 | | | |
| | 8,29 | | | |
| | 4,58 | | | |
| | 5,62 | | | |
| | | | | |
| LS9 | 3,37 | 2,96 | 0,83 | 0,0202 |
| | 2,53 | | | |
| | 2,10 | | | |
| | 2,06 | | | |
| | 2,53 | | | |
| | 2,34 | | | |
| | 1,99 | | | |
| | 3,76 | | | |
| | 4,16 | | | |
| | 4,32 | | | |
| | 3,39 | | | |
| | | | | |
| LS10 | 1,46 | 2,35 | 0,81 | 0,0074 |

2,10
2,35
2,43
1,84
1,96
1,44
2,31
1,94
2,25
3,96
4,11

Tabelle 30: Normierte LUC-Werte nach flg22-Behandlung der Transformation der Tetramere der *cis*-Sequenz 15 und entsprechenden Mutationen in *Arabidopsis thaliana* Protoplasten (Werte aus Abbildung 26A; Werte in Zusammenarbeit mit Alexander Sandmann (2017) gemessen)

| Konstrukte | Experiment | - flg22 | Mittelwert | Std.abw. | + flg22 | Mittelwert | Std.abw. | t-Test |
|------------|------------|----------|------------|----------|----------|------------|----------|--------|
| pBT10-LUC | 1 | 67,10 | 89,95 | 71,74 | 40,78 | 86,69 | 110,16 | 0,9571 |
| | | 60,23 | | | 17,17 | | | |
| | 2 | 38,04 | | | 74,41 | | | |
| | | 244,73 | | | 329,74 | | | |
| | 3 | 36,90 | | | 29,37 | | | |
| | | 92,67 | | | 28,66 | | | |
| D | 1 | 11666,08 | 8107,67 | 3870,79 | 18629,27 | 46554,10 | 29531,90 | 0,0592 |
| | | 4433,01 | | | 22707,28 | | | |
| | 2 | 5363,28 | | | 26723,87 | | | |
| | | 5229,49 | | | 77084,94 | | | |
| | 3 | 13846,50 | | | 87625,12 | | | |
| | | | | | | | | |
| S15 | 1 | 1151,59 | 2197,84 | 1733,07 | 16187,15 | 16549,84 | 6600,48 | 0,0005 |
| | | 1675,09 | | | 8936,56 | | | |
| | 2 | 1893,35 | | | 16128,41 | | | |
| | | 6657,84 | | | 27167,06 | | | |
| | 3 | 1308,14 | | | 12541,06 | | | |
| | | 2371,34 | | | 9436,53 | | | |
| | 4 | 1492,23 | | | 26969,22 | | | |
| | | 1033,16 | | | 15032,75 | | | |
| S15mut4 | 1 | 1462,55 | 1492,24 | 499,33 | 1503,91 | 1993,43 | 868,46 | 0,2497 |
| | | 1144,65 | | | 1575,49 | | | |
| | 2 | 1920,46 | | | 2971,67 | | | |
| | | 686,09 | | | 899,77 | | | |
| | 3 | 1111,40 | | | 1089,89 | | | |
| | | 2062,90 | | | 3098,39 | | | |
| | 4 | 2057,65 | | | 2814,91 | | | |
| | | | | | | | | |
| S15mut5 | 1 | 57,61 | 237,92 | 158,38 | 526,62 | 5046,44 | 3456,31 | 0,0265 |
| | | 21,82 | | | 326,09 | | | |
| | 2 | 188,28 | | | 5979,95 | | | |
| | 3 | 354,77 | | | 8317,98 | | | |
| | 4 | 380,24 | | | 9099,45 | | | |

| | | | | | | | | |
|---------|---|--------|-------|--------|---------|--------|--------|--------|
| | | 424,79 | | | 6028,53 | | | |
| | | 31,89 | | | 20,88 | | | |
| | 1 | 13,48 | | | 17,97 | | | |
| | 2 | 416,99 | | | 516,84 | | | |
| S15mutd | 3 | 43,25 | 92,09 | 133,13 | 149,35 | 179,58 | 168,55 | 0,3391 |
| | | 44,29 | | | 67,54 | | | |
| | 4 | 43,54 | | | 163,16 | | | |
| | | 51,20 | | | 321,29 | | | |

Tabelle 31: Normierte LUC-Werte nach flg22-Behandlung der Transformation der Tetramere der *cis*-Sequenz 24 und entsprechenden Mutationen in *Arabidopsis thaliana* Protoplasten (Werte aus Abbildung 26C; Werte in Zusammenarbeit mit Alexander Sandmann (2017) gemessen)

| Konstrukte | Experiment | - flg22 | Mittelwert | Std.abw. | + flg22 | Mittelwert | Std.abw. | t-Test |
|------------|------------|----------|------------|----------|-----------|------------|----------|--------|
| | 1 | 501,00 | | | 512,92 | | | |
| | | 530,21 | | | 530,21 | | | |
| pBT10-LUC | 2 | 150,02 | 230,74 | 203,93 | 94,20 | 223,41 | 212,45 | 0,9568 |
| | | 48,65 | | | 24,98 | | | |
| | 3 | 80,05 | | | 108,07 | | | |
| | | 74,48 | | | 70,10 | | | |
| | 1 | 17543,36 | | | 59595,34 | | | |
| D | 2 | 28983,67 | 18273,43 | 6503,14 | 93720,91 | 87788,85 | 41355,26 | 0,0602 |
| | | 11848,24 | | | 45239,14 | | | |
| | 3 | 14718,43 | | | 152600,02 | | | |
| | 1 | 1098,95 | | | 25139,40 | | | |
| | | 1301,88 | | | 30396,32 | | | |
| S24 | 2 | 1306,56 | 1672,22 | 1257,52 | 29920,12 | 28142,57 | 13415,87 | 0,0166 |
| | | 4122,70 | | | 48630,18 | | | |
| | 3 | 530,99 | | | 6626,81 | | | |
| | 1 | 148,51 | | | 94,50 | | | |
| | | 392,23 | | | 344,69 | | | |
| S24mut5 | 2 | 29,36 | 177,43 | 108,30 | 36,64 | 201,81 | 142,34 | 0,7672 |
| | | 142,11 | | | 426,33 | | | |
| | 3 | 186,74 | | | 93,37 | | | |
| | | 165,62 | | | 215,31 | | | |
| | 1 | 602,51 | | | 2207,29 | | | |
| | | 682,13 | | | 2963,72 | | | |
| S24mut9 | 2 | 929,37 | 580,80 | 220,66 | 2199,71 | 1859,13 | 792,61 | 0,0296 |
| | | 343,07 | | | 1157,19 | | | |
| | 3 | 346,90 | | | 767,74 | | | |

Tabelle 32: Normierte LUC-Werte nach flg22-Behandlung der Transformation der Tetramere der *cis*-Sequenz 18 und entsprechenden Mutationen in *Arabidopsis thaliana* Protoplasten (Werte in Zusammenarbeit mit Alexander Sandmann (2017) gemessen)

| Konstrukte | Experiment | - flg22 | Mittelwert | Std.abw. | + flg22 | Mittelwert | Std.abw. | t-Test |
|------------|------------|---------|------------|----------|---------|------------|----------|--------|
| pBT10-LUC | 1 | 4835,82 | 7055,06 | 6694,50 | 6221,99 | 5077,71 | 4417,66 | 0,8927 |

| | | | | | | | | |
|-----|---|----------|----------|---------|----------|----------|----------|--------|
| | | 16135,29 | | | 11754,92 | | | |
| | 2 | 194,06 | | | 278,00 | | | |
| | 3 | 1644,74 | | | 2055,92 | | | |
| | 1 | 14743,26 | | | 8411,00 | | | |
| | 2 | 18943,91 | | | 24211,36 | | | |
| | | 12353,29 | | | 12607,46 | | | |
| D | 3 | 27808,53 | 12313,68 | 7957,97 | 7817,69 | 19297,96 | 10968,39 | 0,2330 |
| | 4 | 37009,37 | | | 22903,79 | | | |
| | | 24023,50 | | | 10153,83 | | | |
| | 5 | 203,85 | | | 90,60 | | | |
| | 1 | 205,86 | | | 785,75 | | | |
| | | 133,50 | | | 537,46 | | | |
| | 2 | 229,07 | | | 399,02 | | | |
| S18 | 3 | 971,23 | 433,60 | 285,85 | 333,89 | 726,03 | 415,39 | 0,1841 |
| | | 735,53 | | | 347,61 | | | |
| | 4 | 413,71 | | | 1419,24 | | | |
| | | 346,29 | | | 1259,22 | | | |

Tabelle 33: Normierte LUC-Werte der Kotransformation von NF-κB p65 zusammen mit dem Tetramer von Sequenz 24 und dem nativen WRKY30-Promotor in *Arabidopsis thaliana* Protoplasten (Werte in Zusammenarbeit mit Lena Meißner gemessen; Werte aus Abbildung 27)

| Konstrukte | Experiment | pORE | Mittelwert | Std.abw. | p65-pORE | Mittelwert | Std.abw. |
|------------|------------|--------|------------|----------|----------|------------|----------|
| | 1 | 14,04 | | | 29,43 | | |
| | | 16,20 | | | 34,88 | | |
| pBT10-LUC | 2 | 72,81 | 30,01 | 20,66 | 23,45 | 33,99 | 6,58 |
| | | 14,85 | | | 40,04 | | |
| | 3 | 26,08 | | | 32,74 | | |
| | | 36,06 | | | 43,42 | | |
| | 1 | 159,46 | | | 2423,09 | | |
| | | 163,61 | | | 1946,59 | | |
| S24 | 2 | 100,53 | 147,36 | 45,03 | 787,83 | 1733,77 | 776,25 |
| | | 95,92 | | | 856,55 | | |
| | 3 | 217,28 | | | 2903,66 | | |
| | | | | | 1484,88 | | |
| | 1 | 17,43 | | | 84,62 | | |
| | | 19,46 | | | 118,60 | | |
| S1 | 2 | 36,22 | 22,61 | 8,70 | 80,96 | 86,20 | 15,21 |
| | | 13,86 | | | 83,72 | | |
| | 3 | 15,70 | | | 78,87 | | |
| | | 33,00 | | | 70,41 | | |

Tabelle 34: Induktionsfaktoren der Kotransformation von NF-κB p65 zusammen mit dem Tetramer von Sequenz 24 und dem nativen WRKY30-Promotor in *Arabidopsis thaliana* Protoplasten (Werte in Zusammenarbeit mit Lena Meißner gemessen; Werte aus Tabelle 33 und Abbildung 27)

| Konstrukte | Induktionsfaktor | Mittelwert | Std.abw. | t-Test |
|------------|------------------|------------|----------|--------|
| pBT10-LUC | 2,10 | 1,62 | 0,78 | 0,0014 |
| | 2,15 | | | |
| | 0,32 | | | |
| | 2,70 | | | |
| | 1,26 | | | |
| | 1,20 | | | |
| S24 | 15,20 | 11,44 | 2,73 | |
| | 11,90 | | | |
| | 7,84 | | | |
| | 8,93 | | | |
| | 13,36 | | | |
| S1 | 4,85 | 4,40 | 1,63 | 0,0036 |
| | 6,09 | | | |
| | 2,24 | | | |
| | 6,04 | | | |
| | 5,03 | | | |
| | 2,13 | | | |

Tabelle 35: Normierte GUS-Werte nach Pep25-Behandlung der Kotretransformation von WRKY26 mit dem Tetramer der *cis*-Sequenz 24 im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 30A; Werte in Zusammenarbeit mit Ann-Kathrin Bahlmann (2017) gemessen; t-Test im Vergleich zur GUS-Aktivität von S24 + WRKY26 – Pep25 mit S24 + WRKY26 + Pep25 ergibt einen p-Wert von 0,0030)

| Konstrukte | Experiment | - Pep25 | Mittelwert | Std.abw. | + Pep25 | Mittelwert | Std.abw. |
|-----------------|------------|----------|------------|----------|-----------|------------|----------|
| pBT10 | 1 | 1138,22 | 1806,52 | 874,74 | 749,73 | 1972,42 | 1587,32 |
| | | 967,68 | | | 661,67 | | |
| | 2 | 2331,73 | | | 2196,41 | | |
| | | 3787,37 | | | 5848,44 | | |
| | 3 | 1050,25 | | | 746,29 | | |
| | | 1454,05 | | | 1542,56 | | |
| | 4 | 2047,56 | | | 1718,93 | | |
| | | 1675,33 | | | 2315,30 | | |
| D | 1 | 9418,64 | 12729,47 | 7643,67 | 94909,14 | 75466,50 | 24634,08 |
| | | 6887,17 | | | 75151,59 | | |
| | 2 | 18316,59 | | | 116876,00 | | |
| | | 27334,43 | | | 49341,46 | | |
| | 3 | 7138,43 | | | 46565,35 | | |
| | | 7281,55 | | | 69955,49 | | |
| | 4 | 1666,80 | | | 782,77 | | |
| | | 1896,16 | | | 2102,49 | | |
| pBT10 + pORE | 1 | 6325,83 | 2534,18 | 1525,31 | 4363,48 | 2129,89 | 1230,78 |
| | | 2959,57 | | | 1043,71 | | |
| | 2 | 1175,44 | | | 914,28 | | |
| | | 1566,10 | | | 2626,35 | | |
| | 3 | 2480,13 | | | 3076,13 | | |
| | | 2203,43 | | | | | |
| | 4 | | | | | | |
| | | | | | | | |

| | | | | | | | |
|----------------------------|---|----------|---------|---------|----------|----------|----------|
| pBT10 + WRKY26- pORE | 1 | 3401,29 | 2551,63 | 765,54 | 3103,83 | 3517,27 | 1379,82 |
| | | 2796,71 | | | 3497,15 | | |
| | 2 | 3201,85 | | | 3569,61 | | |
| | | 3534,74 | | | 5483,09 | | |
| | 3 | 1795,02 | | | 2253,56 | | |
| | | 1276,98 | | | 1429,64 | | |
| | 4 | 2399,72 | | | 5756,51 | | |
| | | 2006,74 | | | 3044,78 | | |
| S24 + pORE | 1 | 1486,17 | 3443,95 | 3852,20 | 51292,96 | 44479,15 | 13090,46 |
| | | 1899,61 | | | 45079,76 | | |
| | 2 | 4994,31 | | | 55795,91 | | |
| | | 963,17 | | | 30233,67 | | |
| | 3 | 723,59 | | | 20922,43 | | |
| | | 1723,37 | | | 60532,27 | | |
| | 4 | 12317,48 | | | 47497,06 | | |
| | | | | | | | |
| S24 + WRKY26- pORE | 1 | 3352,44 | 3873,18 | 1882,36 | 18127,31 | 19512,57 | 9310,40 |
| | | 2167,67 | | | 19122,86 | | |
| | 2 | 6778,47 | | | 15000,29 | | |
| | | 5926,84 | | | 22354,89 | | |
| | 3 | 1560,68 | | | 9895,32 | | |
| | | 2334,74 | | | 40158,78 | | |
| | 4 | 4991,44 | | | 11928,58 | | |
| | | | | | | | |

Tabelle 36: Normierte GUS-Werte nach Pep25-Behandlung der Kotransformation von WRKY40 mit dem Tetramer der *cis*-Sequenz 24 im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 30B; t-Test im Vergleich zur GUS-Aktivität von S24 + WRKY40 – Pep25 mit S24 + WRKY40 + Pep25 ergibt einen p-Wert von 0,0001)

| Konstrukte | Experiment | - Pep25 | Mittelwert | Std.abw. | + Pep25 | Mittelwert | Std.abw. |
|-----------------|------------|---------|------------|----------|----------|------------|----------|
| pBT10 | 1 | 1360,56 | 794,51 | 286,07 | 1669,98 | 948,35 | 394,57 |
| | | 800,33 | | | 817,08 | | |
| | 2 | 665,93 | | | 842,63 | | |
| | | 513,73 | | | 779,38 | | |
| | 3 | 537,21 | | | 398,99 | | |
| | | 889,30 | | | 1182,06 | | |
| D | 1 | 7313,33 | 8173,07 | 1046,03 | 42465,27 | 48488,92 | 8988,88 |
| | | | | | 58011,23 | | |
| | 2 | 9056,25 | | | 55191,82 | | |
| | | | | | 33804,71 | | |
| | 3 | 9356,61 | | | 57334,77 | | |
| | | 6966,10 | | | 44125,72 | | |
| pBT10 + pORE | 1 | 1549,57 | 1160,12 | 405,16 | 792,00 | 853,80 | 272,89 |
| | | 970,75 | | | 759,32 | | |
| | 2 | 815,74 | | | 599,51 | | |
| | | 637,05 | | | 560,21 | | |
| | 3 | 1795,88 | | | 1073,14 | | |
| | | 1191,71 | | | 1338,66 | | |
| | 1 | 1006,74 | 940,89 | 185,89 | 505,83 | 818,26 | 311,53 |

| | | | | | | | |
|----------------------------|---|---------|---------|--------|----------|----------|---------|
| pBT10 + WRKY40- pORE | 2 | 804,77 | 1220,74 | 208,33 | 464,98 | 13010,98 | 2117,84 |
| | | 1031,81 | | | 1296,56 | | |
| | 3 | 616,70 | | | 738,00 | | |
| | | 1204,54 | | | 1162,85 | | |
| S24 + pORE | 1 | 980,82 | 1220,74 | 208,33 | 741,35 | 13010,98 | 2117,84 |
| | | 1019,40 | | | 12994,33 | | |
| | 2 | 1438,37 | | | 9286,91 | | |
| | | 893,30 | | | 14543,26 | | |
| S24 + WRKY40- pORE | 3 | 1431,93 | 1220,74 | 208,33 | 11888,48 | 13010,98 | 2117,84 |
| | | 1182,15 | | | 13282,38 | | |
| | 1 | 1359,30 | | | 16070,54 | | |
| | | 194,45 | | | 4751,27 | | |
| S24 + WRKY40- pORE | 2 | 197,09 | 1220,74 | 208,33 | 3520,83 | 13010,98 | 2117,84 |
| | | 221,02 | | | 5611,99 | | |
| | 3 | 205,76 | | | 5018,17 | | |
| | | 276,25 | | | 8071,00 | | |
| S24 + WRKY40- pORE | 1 | 189,59 | 1220,74 | 208,33 | 4253,91 | 13010,98 | 2117,84 |
| | | 194,45 | | | 4751,27 | | |
| | 2 | 197,09 | | | 3520,83 | | |
| | | 221,02 | | | 5611,99 | | |
| S24 + WRKY40- pORE | 3 | 205,76 | 1220,74 | 208,33 | 5018,17 | 13010,98 | 2117,84 |
| | | 276,25 | | | 8071,00 | | |
| | 1 | 189,59 | | | 4253,91 | | |
| | | 194,45 | | | 4751,27 | | |

Tabelle 37: Normierte GUS-Werte nach Pep25-Behandlung der Kotransformation von WRKY41 mit dem Tetramer der *cis*-Sequenz 24 im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 30C; Werte in Zusammenarbeit mit Ann-Kathrin Bahlmann (2017) gemessen; t-Test im Vergleich zur GUS-Aktivität von S24 + WRKY41 – Pep25 mit S24 + WRKY41 + Pep25 ergibt einen p-Wert von 0,0036)

| Konstrukte | Experiment | - Pep25 | Mittelwert | Std.abw. | + Pep25 | Mittelwert | Std.abw. |
|-----------------|------------|----------|------------|----------|-----------|------------|----------|
| pBT10 | 1 | 1482,56 | 1719,39 | 762,28 | 2032,03 | 2076,24 | 1123,31 |
| | | 1140,96 | | | 1574,31 | | |
| | 2 | 3202,73 | | | 4714,74 | | |
| | | 2402,97 | | | 2500,89 | | |
| | 3 | 1925,10 | | | 2097,83 | | |
| | | 1899,78 | | | 1822,64 | | |
| | 4 | 903,26 | | | 1041,85 | | |
| | | 797,78 | | | 825,64 | | |
| D | 1 | 18230,80 | 12311,31 | 6584,07 | 120405,86 | 92439,85 | 40323,96 |
| | | 10356,72 | | | 69000,52 | | |
| | 2 | 23290,27 | | | 161446,27 | | |
| | | 19835,57 | | | 143830,75 | | |
| | 3 | 7099,04 | | | 70239,27 | | |
| | | 8182,35 | | | 71385,53 | | |
| | 4 | 5293,36 | | | 52765,76 | | |
| | | 6202,37 | | | 50444,85 | | |
| pBT10 + pORE | 1 | 1554,75 | 2275,97 | 871,95 | 1774,20 | 2368,00 | 861,18 |
| | | 1734,45 | | | 2775,80 | | |
| | 2 | 3104,34 | | | 3911,27 | | |
| | | 4121,81 | | | 1854,92 | | |
| | 3 | 2156,06 | | | 3158,85 | | |
| | | 2480,47 | | | 1731,41 | | |
| | 4 | 1539,53 | | | 1731,41 | | |
| | | 1539,53 | | | 1731,41 | | |

| | | | | | | | |
|----------------------------|---|---------|---------|---------|----------|----------|----------|
| | | 1516,32 | | | 1369,55 | | |
| pBT10 + WRKY41- pORE | 1 | 1705,62 | 3109,03 | 1311,34 | 1190,85 | 2747,34 | 1311,92 |
| | | 2454,50 | | | 2378,47 | | |
| | 2 | 4238,75 | | | 4024,38 | | |
| | | 5081,71 | | | 5201,90 | | |
| | 3 | 4124,39 | | | 2906,20 | | |
| | | 1938,52 | | | 1905,45 | | |
| | 4 | 3967,23 | | | 3232,14 | | |
| | | 1361,56 | | | 1139,35 | | |
| S24 + pORE | 1 | 1715,18 | 1433,84 | 494,14 | 17262,75 | 33610,44 | 11669,99 |
| | | 1380,79 | | | 22022,07 | | |
| | 2 | 2439,77 | | | 34695,61 | | |
| | | 1766,94 | | | 28189,36 | | |
| | 3 | 1173,72 | | | 33490,46 | | |
| | | 1130,30 | | | 57574,41 | | |
| | 4 | 1138,26 | | | 42703,23 | | |
| | | 725,72 | | | 32945,61 | | |
| S24 + WRKY41- pORE | 1 | 1960,76 | 2809,17 | 944,00 | 7538,21 | 15104,65 | 5969,40 |
| | | 2549,63 | | | 10587,66 | | |
| | 2 | 3791,78 | | | 22010,01 | | |
| | | 3985,51 | | | 24656,44 | | |
| | 3 | 3961,78 | | | 12380,08 | | |
| | | 2908,42 | | | 20382,45 | | |
| | 4 | 1620,82 | | | 9493,46 | | |
| | | 1694,70 | | | 13788,92 | | |

Tabelle 38: Normierte GUS-Werte der Kotransformation von WRKY41AD mit den Tetrameren der *cis*-Sequenzen 24 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 31; Werte in Zusammenarbeit mit Ann-Kathrin Bahlmann (2017) gemessen)

| Konstrukte | Experiment | + pORE | Mittelwert | Std.abw. | + WRKY41AD- pORE | Mittelwert | Std.abw. |
|------------|------------|---------|------------|----------|------------------------|------------|----------|
| pBT10 | 1 | 2052,11 | 1208,32 | 383,67 | 2476,88 | 1791,29 | 433,65 |
| | | 1449,12 | | | 2344,49 | | |
| | | 1602,19 | | | 2126,40 | | |
| | | 1414,56 | | | 1925,07 | | |
| | 2 | 584,30 | | | 2099,17 | | |
| | | 1136,97 | | | 1900,94 | | |
| | | 933,61 | | | 1814,59 | | |
| | | 1209,79 | | | 1501,71 | | |
| | 3 | 861,67 | | | 1530,56 | | |
| | | 777,85 | | | 861,93 | | |
| | | 1342,54 | | | 1500,25 | | |
| | | 1135,18 | | | 1413,51 | | |
| S24 | 1 | 868,28 | 808,51 | 398,69 | 8640,48 | 8331,06 | 3050,73 |
| | | 924,34 | | | 8184,50 | | |

| | | | | | | | |
|---------|----|---------|--------|--------|----------|---------|--------|
| | | 1164,97 | | | 10607,84 | | |
| | | 1134,36 | | | 7199,77 | | |
| | | 604,47 | | | 7434,89 | | |
| | 2 | | | | 7425,08 | | |
| | | | | | 8094,86 | | |
| | | | | | 7611,99 | | |
| | | 492,08 | | | 7656,50 | | |
| | 3 | 740,49 | | | 5059,09 | | |
| | | 665,27 | | | 5120,88 | | |
| | | 1122,24 | | | 4226,29 | | |
| | | 466,19 | | | 5964,12 | | |
| | 4 | 370,35 | | | 4570,97 | | |
| | | 404,58 | | | 4580,93 | | |
| | | 403,61 | | | 4074,79 | | |
| | | 878,75 | | | 6963,27 | | |
| | 5 | 707,50 | | | 7595,08 | | |
| | | 639,03 | | | 6513,62 | | |
| | | 885,69 | | | 5853,42 | | |
| | | 551,78 | | | 7057,23 | | |
| | 6 | 803,20 | | | 8116,98 | | |
| | | 590,85 | | | 6697,94 | | |
| | | 845,63 | | | 7757,86 | | |
| | | 2086,83 | | | 10253,88 | | |
| | 7 | 1391,66 | | | 15655,78 | | |
| | | 1355,72 | | | 13538,02 | | |
| | | 1832,62 | | | 12221,63 | | |
| | | 1010,37 | | | 7307,17 | | |
| | 8 | 1444,70 | | | 14296,95 | | |
| | | 1014,63 | | | 7710,12 | | |
| | | 1004,99 | | | 8502,60 | | |
| | | 488,01 | | | 5817,33 | | |
| | 9 | 446,44 | | | 10305,92 | | |
| | | 397,05 | | | 7762,26 | | |
| | | 428,09 | | | 5537,46 | | |
| | | 771,06 | | | | | |
| | 10 | 632,16 | | | 15625,16 | | |
| | | | | | 10362,70 | | |
| | | | | | 15378,74 | | |
| | | 569,64 | | | 8098,86 | | |
| | 11 | 522,34 | | | 12462,40 | | |
| | | 571,79 | | | 5977,76 | | |
| | | 300,00 | | | 8412,35 | | |
| | | 608,73 | | | 1252,78 | | |
| | 1 | 503,57 | | | 758,06 | | |
| S24mut2 | | 562,20 | 765,27 | 190,29 | 934,39 | 1390,29 | 362,84 |
| | | 547,97 | | | 933,84 | | |
| | 2 | 1008,88 | | | 1268,79 | | |

| | | | | | | | |
|---------|---|---------|---------|---------|----------|---------|---------|
| | | 1042,73 | | | 1502,45 | | |
| | | 879,19 | | | 1764,74 | | |
| | | 979,87 | | | | | |
| | | 775,29 | | | 1749,22 | | |
| | 3 | 703,55 | | | 1626,81 | | |
| | | 622,88 | | | 1732,04 | | |
| | | 948,36 | | | 1770,11 | | |
| | | 838,83 | | | 2268,22 | | |
| | 1 | 899,41 | | | 2182,08 | | |
| | | 661,59 | | | 2599,77 | | |
| | | 972,58 | | | 1884,49 | | |
| | | 5873,43 | | | 6108,80 | | |
| | 2 | 2641,43 | | | 5074,10 | | |
| | | 3725,94 | | | 4950,56 | | |
| | | 3841,00 | | | 6567,22 | | |
| | | 2219,53 | | | 4140,40 | | |
| S24mut4 | 3 | 2181,81 | 2751,53 | 1489,86 | 4220,87 | 4847,41 | 1802,65 |
| | | 2622,97 | | | 4911,22 | | |
| | | 2008,01 | | | 5747,96 | | |
| | | 3238,96 | | | 8256,14 | | |
| | 4 | 5059,18 | | | 7361,44 | | |
| | | 4318,65 | | | 5321,10 | | |
| | | 5294,54 | | | 8179,81 | | |
| | | 1610,25 | | | 4274,85 | | |
| | 5 | 2316,35 | | | 4832,76 | | |
| | | 2803,54 | | | 4318,58 | | |
| | | 1902,65 | | | 3747,84 | | |
| | | 1202,29 | | | 7922,34 | | |
| | 1 | 1314,71 | | | 10554,91 | | |
| | | 1415,70 | | | 13139,61 | | |
| | | 1101,11 | | | 10973,32 | | |
| | | 1070,40 | | | 8511,27 | | |
| S24mut5 | 2 | 1353,31 | 1155,07 | 153,41 | 7933,35 | 9679,17 | 1609,52 |
| | | 1230,44 | | | 8039,49 | | |
| | | 1129,87 | | | | | |
| | | 852,65 | | | 9421,37 | | |
| | 3 | 1137,66 | | | 10251,57 | | |
| | | 970,81 | | | 11171,79 | | |
| | | 1081,92 | | | 8551,81 | | |
| | | 256,13 | | | 2608,42 | | |
| | 1 | 276,15 | | | 1991,82 | | |
| | | 336,12 | | | 2634,09 | | |
| | | 296,98 | | | 2101,64 | | |
| S24mut6 | | 1839,56 | 661,08 | 381,47 | 4289,22 | 4382,64 | 1338,48 |
| | | 551,94 | | | 4394,99 | | |
| | 2 | 531,30 | | | 5426,91 | | |
| | | 502,08 | | | 5308,35 | | |

| | | | | | | | |
|---------|---|---------|--------|--------|---------|--------|--------|
| | | 483,07 | | | 3943,40 | | |
| | 3 | 525,37 | | | 4173,72 | | |
| | | 416,89 | | | 4376,94 | | |
| | | 480,56 | | | 3813,05 | | |
| | | 792,73 | | | 5659,24 | | |
| | 4 | 687,39 | | | 7652,38 | | |
| | | 1461,96 | | | 5539,96 | | |
| | | 924,32 | | | 5727,87 | | |
| | | 734,31 | | | 3919,01 | | |
| | 5 | 858,66 | | | 4499,17 | | |
| | | 642,78 | | | 5068,41 | | |
| | | 623,26 | | | 4524,18 | | |
| | | 394,51 | | | 493,64 | | |
| | 1 | 405,69 | | | 588,75 | | |
| | | 376,80 | | | 539,61 | | |
| | | 303,11 | | | 522,80 | | |
| | | 536,01 | | | 748,32 | | |
| S24mut7 | 2 | 940,34 | 552,54 | 215,47 | 891,67 | 703,11 | 140,98 |
| | | | | | 826,70 | | |
| | | 958,63 | | | 803,51 | | |
| | 3 | 567,58 | | | 644,65 | | |
| | | 580,05 | | | 842,87 | | |
| | | 462,70 | | | 831,67 | | |

Tabelle 39: Induktionsfaktoren der Kotransformation von WRKY41AD mit den Tetrameren der *cis*-Sequenzen 24 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (Werte aus Tabelle 38 und Abbildung 31; Werte in Zusammenarbeit mit Ann-Kathrin Bahlmann (2017) gemessen; *t*-Test im Vergleich zu den Induktionsfaktoren von pBT10 mit S24mut2 ergibt einen p-Wert von 0,02319, sowie von pBT10 mit S24mut4 einen p-Wert von 0,0989 und von pBT10 mit S24mut7 einen p-Wert von 0,2582)

| Konstrukte | Induktionsfaktor | Mittelwert | Std.abw. | <i>t</i> -Test |
|------------|------------------|------------|----------|----------------|
| | 1,21 | | | |
| | 1,62 | | | |
| | 1,33 | | | |
| | 1,36 | | | |
| | 3,59 | | | |
| pBT10 | 1,67 | 1,60 | 0,65 | 0,0000 |
| | 1,94 | | | |
| | 1,24 | | | |
| | 1,78 | | | |
| | 1,11 | | | |
| | 1,12 | | | |
| | 1,25 | | | |
| | 9,95 | | | |
| S24 | 8,85 | 11,60 | 5,46 | |
| | 9,11 | | | |
| | 6,35 | | | |

| | | | | |
|---------|-------|------|------|--------|
| | 12,30 | | | |
| | 15,56 | | | |
| | 6,83 | | | |
| | 7,70 | | | |
| | 3,77 | | | |
| | 12,79 | | | |
| | 12,34 | | | |
| | 11,32 | | | |
| | 10,10 | | | |
| | 7,92 | | | |
| | 10,74 | | | |
| | 10,19 | | | |
| | 6,61 | | | |
| | 12,79 | | | |
| | 10,11 | | | |
| | 11,34 | | | |
| | 9,17 | | | |
| | 4,91 | | | |
| | 11,25 | | | |
| | 9,99 | | | |
| | 6,67 | | | |
| | 7,23 | | | |
| | 9,90 | | | |
| | 7,60 | | | |
| | 8,46 | | | |
| | 11,92 | | | |
| | 23,08 | | | |
| | 19,55 | | | |
| | 12,94 | | | |
| | 24,72 | | | |
| | 14,22 | | | |
| | 23,86 | | | |
| | 10,45 | | | |
| | 28,04 | | | |
| | 2,06 | | | |
| | 1,51 | | | |
| | 1,66 | | | |
| | 1,70 | | | |
| | 1,26 | | | |
| S24mut2 | 1,44 | 1,90 | 0,42 | 0,0000 |
| | 2,01 | | | |
| | 2,26 | | | |
| | 2,31 | | | |
| | 2,78 | | | |
| | 1,87 | | | |
| S24mut4 | 2,70 | | | |
| | 2,43 | 2,03 | 0,66 | 0,0000 |

| | | | | |
|---------|-------|------|------|--------|
| | 3,93 | | | |
| | 1,94 | | | |
| | 1,04 | | | |
| | 1,92 | | | |
| | 1,33 | | | |
| | 1,71 | | | |
| | 1,87 | | | |
| | 1,93 | | | |
| | 1,87 | | | |
| | 2,86 | | | |
| | 2,55 | | | |
| | 1,46 | | | |
| | 1,23 | | | |
| | 1,54 | | | |
| | 2,65 | | | |
| | 2,09 | | | |
| | 1,54 | | | |
| | 1,97 | | | |
| | 6,59 | | | |
| | 8,03 | | | |
| | 9,28 | | | |
| | 9,97 | | | |
| | 7,95 | | | |
| S24mut5 | 5,86 | 8,52 | 1,76 | 0,0054 |
| | 6,53 | | | |
| | 11,05 | | | |
| | 9,01 | | | |
| | 11,51 | | | |
| | 7,90 | | | |
| | 10,18 | | | |
| | 7,21 | | | |
| | 7,84 | | | |
| | 7,08 | | | |
| | 2,33 | | | |
| | 7,96 | | | |
| | 10,21 | | | |
| | 10,57 | | | |
| S24mut6 | 8,16 | 7,60 | 2,23 | 0,0003 |
| | 7,94 | | | |
| | 10,50 | | | |
| | 7,93 | | | |
| | 7,14 | | | |
| | 11,13 | | | |
| | 3,79 | | | |
| | 6,20 | | | |
| | 5,34 | | | |
| | 5,24 | | | |

| | | | | |
|---------|------|------|------|--------|
| | 7,89 | | | |
| | 7,26 | | | |
| | 1,25 | | | |
| | 1,45 | | | |
| | 1,43 | | | |
| | 1,72 | | | |
| S24mut7 | 1,40 | 1,34 | 0,29 | 0,0000 |
| | 0,95 | | | |
| | 0,84 | | | |
| | 1,14 | | | |
| | 1,45 | | | |
| | 1,80 | | | |

Tabelle 40: Normierte GUS-Werte der Kotransformation von WRKY26AD mit den Tetrameren der *cis*-Sequenzen 24 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 32; Werte in Zusammenarbeit mit Ann-Kathrin Bahlmann (2017) gemessen)

| Konstrukte | Experiment | + pORE | Mittelwert | Std.abw. | + WRKY26AD- pORE | Mittelwert | Std.abw. | | |
|------------|------------|----------|------------|----------|---------------------|------------|----------|--------|---------|
| pBT10 | 1 | 592,05 | 1341,40 | 510,81 | 1114,17 | 1380,38 | 362,76 | | |
| | | 752,47 | | | 890,23 | | | | |
| | 2 | 1176,92 | | | 1271,84 | | | | |
| | | 986,15 | | | 896,90 | | | | |
| | 3 | 2060,18 | | | 1873,36 | | | | |
| | | 1832,81 | | | 1696,15 | | | | |
| | | 1835,31 | | | 1587,92 | | | | |
| | | 1495,30 | | | 1712,49 | | | | |
| | | S24 | | | 1 | | | 732,82 | 3923,87 |
| | | | | | | | | 931,64 | 4130,11 |
| 728,59 | 7672,41 | | | | | | | | |
| 684,16 | 3704,92 | | | | | | | | |
| 2 | 2465,98 | | 14841,06 | | | | | | |
| | 1906,94 | | 8338,27 | | | | | | |
| | 1284,48 | | 10456,27 | | | | | | |
| | 1324,86 | | 5862,83 | | | | | | |
| 3 | 539,33 | | 7954,49 | | | | | | |
| | 584,13 | | 8737,64 | | | | | | |
| | 664,58 | 8401,62 | | | | | | | |
| | 689,95 | 6052,26 | | | | | | | |
| 4 | 1125,18 | 12951,11 | | | | | | | |
| | 210,67 | 7727,52 | | | | | | | |
| | 283,81 | 8811,00 | | | | | | | |
| | 139,71 | 6351,55 | | | | | | | |
| | 5 | 310,11 | 4326,78 | | | | | | |
| | | 575,11 | 8837,08 | | | | | | |
| | | 496,37 | 8610,84 | | | | | | |
| | | 473,31 | 5684,71 | | | | | | |

| | | | | | | | |
|---------|----|---------|---------|--------|----------|---------|---------|
| | | 496,88 | | | 7246,01 | | |
| | 6 | 541,03 | | | 5784,54 | | |
| | | 587,99 | | | 8567,00 | | |
| | | 539,86 | | | 8895,12 | | |
| | | 605,36 | | | 5802,46 | | |
| | 7 | 570,16 | | | 4844,51 | | |
| | | 928,27 | | | 6028,60 | | |
| | | 691,14 | | | 3222,27 | | |
| | | 717,78 | | | 11188,91 | | |
| | 8 | 321,17 | | | 18397,43 | | |
| | | 338,94 | | | 8115,13 | | |
| | | 226,99 | | | 11305,63 | | |
| | | 1378,72 | | | 5321,92 | | |
| | 9 | 403,17 | | | 6349,17 | | |
| | | | | | 8505,35 | | |
| | | 1392,49 | | | 3624,35 | | |
| | | 1035,53 | | | 3377,35 | | |
| | 10 | 1013,64 | | | 4616,87 | | |
| | | 1171,42 | | | 5809,22 | | |
| | | 1063,90 | | | 2435,93 | | |
| | | 615,99 | | | 15074,38 | | |
| | 11 | 535,19 | | | 8037,52 | | |
| | | 782,07 | | | 12820,05 | | |
| | | 610,22 | | | 8065,17 | | |
| | | 834,98 | | | | | |
| | 12 | 1357,57 | | | | | |
| | | 844,57 | | | | | |
| | | 919,59 | | | | | |
| | | 1166,84 | | | 2081,93 | | |
| | 1 | 1317,01 | | | 3413,68 | | |
| | | 1059,97 | | | 1865,99 | | |
| | | 831,03 | | | 1857,88 | | |
| | | 1001,52 | | | 3094,35 | | |
| | 2 | 972,80 | | | 2956,09 | | |
| | | 1070,80 | | | 4442,40 | | |
| | | 836,84 | | | 4937,60 | | |
| S24mut2 | | 431,97 | 899,01 | 270,22 | 1936,11 | 2729,05 | 948,75 |
| | 3 | 527,33 | | | 2675,38 | | |
| | | 649,89 | | | 1549,47 | | |
| | | 480,73 | | | 1785,67 | | |
| | | 1068,64 | | | 3103,19 | | |
| | 4 | 1170,76 | | | 1897,23 | | |
| | | | | | 2831,81 | | |
| | | | | | 3236,03 | | |
| | | 1645,21 | | | 6491,60 | | |
| S24mut4 | 1 | 2013,36 | 1333,01 | 663,74 | 6098,67 | 5493,37 | 1210,05 |
| | | 2269,73 | | | 6726,14 | | |

| | | | | | | | |
|---------|---|---------|---------|--------|----------|---------|---------|
| | | 2793,83 | | | 6561,85 | | |
| | | 950,95 | | | 6067,37 | | |
| | 2 | 634,77 | | | 6242,36 | | |
| | | 819,39 | | | 6163,79 | | |
| | | 760,91 | | | 6132,67 | | |
| | | 771,02 | | | 3305,41 | | |
| | 3 | 1021,77 | | | 4657,78 | | |
| | | 1246,76 | | | 3999,60 | | |
| | | 1068,46 | | | 3473,18 | | |
| | | 967,36 | | | 3457,62 | | |
| | 1 | 992,70 | | | 2634,67 | | |
| | | 1060,86 | | | 3828,83 | | |
| | | 717,54 | | | 2997,62 | | |
| | | 2807,88 | | | 9689,08 | | |
| | 2 | 2723,79 | | | 7016,09 | | |
| | | 2415,10 | | | 6933,00 | | |
| | | 2643,61 | | | 17642,31 | | |
| | | 1228,01 | | | 3199,37 | | |
| | 3 | 1412,00 | | | 4429,72 | | |
| | | 911,57 | | | 5104,60 | | |
| | | 1220,60 | | | 4404,65 | | |
| | | 990,53 | | | 5723,05 | | |
| | 4 | 1242,94 | | | 4724,99 | | |
| | | 1576,56 | | | 8573,24 | | |
| S24mut5 | | 1153,90 | 1236,12 | 603,16 | 8884,10 | 5509,16 | 3008,39 |
| | | 613,17 | | | 4787,56 | | |
| | 5 | 466,33 | | | 2741,96 | | |
| | | 576,51 | | | 1805,08 | | |
| | | 631,55 | | | 2565,64 | | |
| | | 1030,89 | | | 7859,20 | | |
| | 6 | 790,69 | | | 4105,98 | | |
| | | 1315,49 | | | 3257,62 | | |
| | | 835,02 | | | 8310,84 | | |
| | | 970,23 | | | 5200,25 | | |
| | 7 | 852,24 | | | 3479,31 | | |
| | | 1090,12 | | | 4683,54 | | |
| | | 704,35 | | | 2560,64 | | |
| | | 1381,00 | | | 6717,68 | | |
| | 8 | 1320,04 | | | 5414,40 | | |
| | | 1447,78 | | | 6312,09 | | |
| | | 1465,40 | | | 7248,52 | | |
| | | 452,40 | | | 1319,49 | | |
| | 1 | 337,79 | | | | | |
| S24mut6 | | 438,12 | 305,07 | 87,67 | 1466,25 | 1717,45 | 462,75 |
| | | 442,75 | | | 2073,75 | | |
| | 2 | 216,31 | | | | | |
| | | 263,20 | | | 2064,77 | | |

| | | | | | | | |
|---------|---|--------|--------|--------|---------|--------|--------|
| | | 261,19 | | | 2574,28 | | |
| | | 211,81 | | | 1402,29 | | |
| | | 267,68 | | | 1122,68 | | |
| | 3 | 306,98 | | | 1148,43 | | |
| | | 242,30 | | | 2011,39 | | |
| | | 220,26 | | | 1991,16 | | |
| | | 646,38 | | | 672,07 | | |
| | 1 | 779,63 | | | 542,75 | | |
| | | 681,43 | | | 455,48 | | |
| | | 622,71 | | | 598,56 | | |
| | | 627,87 | | | 535,49 | | |
| | 2 | 444,29 | | | 430,78 | | |
| | | 448,81 | | | 470,17 | | |
| | | 393,37 | | | 448,96 | | |
| S24mut7 | | 418,21 | 577,07 | 142,78 | 634,53 | 576,91 | 109,66 |
| | 3 | 423,45 | | | 650,07 | | |
| | | 426,21 | | | 692,84 | | |
| | | 459,71 | | | 791,22 | | |
| | | 736,12 | | | | | |
| | 4 | 561,51 | | | | | |
| | | 747,87 | | | | | |
| | | 815,58 | | | | | |

Tabelle 41: Induktionsfaktoren der Kotransformation von WRKY26AD mit den Tetrameren der *cis*-Sequenzen 24 und entsprechenden Mutationen im Petersilienprotoplastensystem (Werte aus Tabelle 40 und Abbildung 32; Werte in Zusammenarbeit mit Ann-Kathrin Bahlmann (2017) gemessen; *t*-Test im Vergleich zu den Induktionsfaktoren von pBT10 mit S24mut2 ergibt sich ein *p*-Wert von 0,0000, sowie bei pBT10 mit S24mut7 einen *p*-Wert von 0,8250)

| Konstrukte | Induktionsfaktor | Mittelwert | Std.abw. | <i>t</i> -Test |
|------------|------------------|------------|----------|----------------|
| | 1,88 | | | |
| | 1,18 | | | |
| | 1,08 | | | |
| pBT10 | 0,91 | 1,11 | 0,31 | 0,0000 |
| | 0,91 | | | |
| | 0,93 | | | |
| | 0,87 | | | |
| | 1,15 | | | |
| | 5,35 | | | |
| | 4,43 | | | |
| | 10,53 | | | |
| | 5,42 | | | |
| S24 | 6,02 | 14,46 | 2,04 | |
| | 4,37 | | | |
| | 8,14 | | | |
| | 4,43 | | | |
| | 14,75 | | | |
| | 14,96 | | | |

| | | | | |
|---------|-------|------|------|--------|
| | 12,64 | | | |
| | 8,77 | | | |
| | 11,51 | | | |
| | 36,68 | | | |
| | 31,05 | | | |
| | 45,46 | | | |
| | 13,95 | | | |
| | 15,37 | | | |
| | 17,35 | | | |
| | 12,01 | | | |
| | 14,58 | | | |
| | 10,69 | | | |
| | 14,57 | | | |
| | 16,48 | | | |
| | 9,59 | | | |
| | 8,50 | | | |
| | 6,49 | | | |
| | 4,66 | | | |
| | 15,59 | | | |
| | 57,28 | | | |
| | 23,94 | | | |
| | 49,81 | | | |
| | 3,86 | | | |
| | 15,75 | | | |
| | 2,60 | | | |
| | 3,26 | | | |
| | 4,55 | | | |
| | 4,96 | | | |
| | 2,29 | | | |
| | 24,47 | | | |
| | 15,02 | | | |
| | 16,39 | | | |
| | 13,22 | | | |
| | 1,78 | | | |
| | 2,59 | | | |
| | 1,76 | | | |
| | 2,24 | | | |
| | 3,09 | | | |
| | 3,04 | | | |
| S24mut2 | 4,15 | 3,19 | 1,30 | 0,0000 |
| | 5,90 | | | |
| | 4,48 | | | |
| | 5,07 | | | |
| | 2,38 | | | |
| | 3,71 | | | |
| | 2,90 | | | |
| | 1,62 | | | |

| | | | | |
|---------|------|------|------|--------|
| | 3,95 | | | |
| | 3,03 | | | |
| | 2,96 | | | |
| | 2,35 | | | |
| | 6,38 | | | |
| S24mut4 | 9,83 | 4,95 | 2,62 | 0,0000 |
| | 7,52 | | | |
| | 8,06 | | | |
| | 4,29 | | | |
| | 4,56 | | | |
| | 3,21 | | | |
| | 3,25 | | | |
| | 3,57 | | | |
| | 2,65 | | | |
| | 3,61 | | | |
| | 4,18 | | | |
| | 3,45 | | | |
| | 2,58 | | | |
| | 2,87 | | | |
| | 6,67 | | | |
| | 2,61 | | | |
| | 3,14 | | | |
| | 5,60 | | | |
| | 3,61 | | | |
| | 5,78 | | | |
| | 3,80 | | | |
| | 5,44 | | | |
| S24mut5 | 7,70 | 4,66 | 1,24 | 0,0000 |
| | 7,81 | | | |
| | 5,88 | | | |
| | 3,13 | | | |
| | 4,06 | | | |
| | 7,62 | | | |
| | 5,19 | | | |
| | 2,48 | | | |
| | 9,95 | | | |
| | 5,36 | | | |
| | 4,08 | | | |
| | 4,30 | | | |
| | 3,64 | | | |
| | 4,86 | | | |
| | 4,10 | | | |
| | 4,36 | | | |
| | 4,95 | | | |
| | 2,92 | | | |
| S24mut6 | 3,35 | 6,05 | 2,48 | 0,0002 |
| | 4,68 | | | |

| | | | | |
|---------|------|------|------|--------|
| | 7,84 | | | |
| | 9,86 | | | |
| | 6,62 | | | |
| | 4,19 | | | |
| | 3,74 | | | |
| | 8,30 | | | |
| | 9,04 | | | |
| | 1,04 | | | |
| | 0,70 | | | |
| | 0,67 | | | |
| | 0,96 | | | |
| | 0,85 | | | |
| S24mut7 | 0,97 | 1,15 | 0,16 | 0,0000 |
| | 1,05 | | | |
| | 1,14 | | | |
| | 1,52 | | | |
| | 1,54 | | | |
| | 1,63 | | | |
| | 1,72 | | | |

Tabelle 42: Normierte GUS-Werte nach Pep25-Behandlung der Kotransformation von WRKY40 mit dem Tetramer der *cis*-Sequenz 18 im Petersilienprotoplastensystem (GUS-Aktivität in pmol 4-MU/mg/min; Werte aus Abbildung 35; t-Test im Vergleich zur GUS-Aktivität von S18 + WRKY40 – Pep25 mit S18+ WRKY40 + Pep25 ergibt einen p-Wert von 0,0004)

| Konstrukte | Experiment | - Pep25 | Mittelwert | Std.abw. | + Pep25 | Mittelwert | Std.abw. |
|----------------------------|------------|---------|------------|----------|----------|------------|----------|
| pBT10 | 1 | 1764,77 | 1196,32 | 313,26 | 1527,72 | 1156,61 | 245,41 |
| | | 1076,28 | | | 1379,08 | | |
| | 2 | 1349,63 | | | 993,46 | | |
| | | 890,36 | | | 781,80 | | |
| | 3 | 1261,06 | | | 1076,45 | | |
| | | 835,84 | | | 1181,16 | | |
| D | 1 | 8313,96 | 5147,97 | 2200,15 | 86358,42 | 81212,39 | 13969,40 |
| | | | | | 91420,65 | | |
| | 2 | 2346,00 | | | 74061,67 | | |
| | | 3046,75 | | | 54060,19 | | |
| | 3 | 5566,67 | | | 84675,27 | | |
| | | 6466,45 | | | 96698,14 | | |
| pBT10 + pORE | 1 | 1903,44 | 1227,30 | 331,32 | 2001,67 | 1315,30 | 380,85 |
| | | 1309,30 | | | 1200,57 | | |
| | 2 | 1114,34 | | | 1572,24 | | |
| | | 899,42 | | | 841,87 | | |
| | 3 | 1178,46 | | | 1009,66 | | |
| | | 958,83 | | | 1265,76 | | |
| pBT10 + WRKY40- pORE | 1 | 3674,31 | 1836,22 | 885,08 | 2250,09 | 1845,61 | 315,96 |
| | | 1612,17 | | | 1886,38 | | |
| | 2 | 876,64 | | | 1231,99 | | |
| | | 1309,23 | | | 1746,27 | | |

| | | | | | | | |
|--------------------------|---|--------------------|---------|---------|----------------------|----------|---------|
| | 3 | 1952,53 1592,43 | | | 1903,71 2055,25 | | |
| | 1 | 5791,07 4625,44 | | | 8795,84 10548,07 | | |
| S18 + pORE | 2 | 2545,15 3820,18 | 4533,90 | 1077,78 | 9396,98 8416,83 | 11142,07 | 2724,36 |
| | 3 | 5209,02 5212,54 | | | 15457,67 14237,00 | | |
| | 1 | 1667,34 2777,67 | | | 1241,49 1698,07 | | |
| S18 + WRKY40- pORE | 2 | 1363,10 1619,64 | 1889,77 | 447,73 | 1262,99 960,52 | 1608,56 | 530,04 |
| | 3 | 1900,80 2010,10 | | | 1931,36 2556,90 | | |

8.3. 3-AT-Test der verschiedenen Bait-Stämme

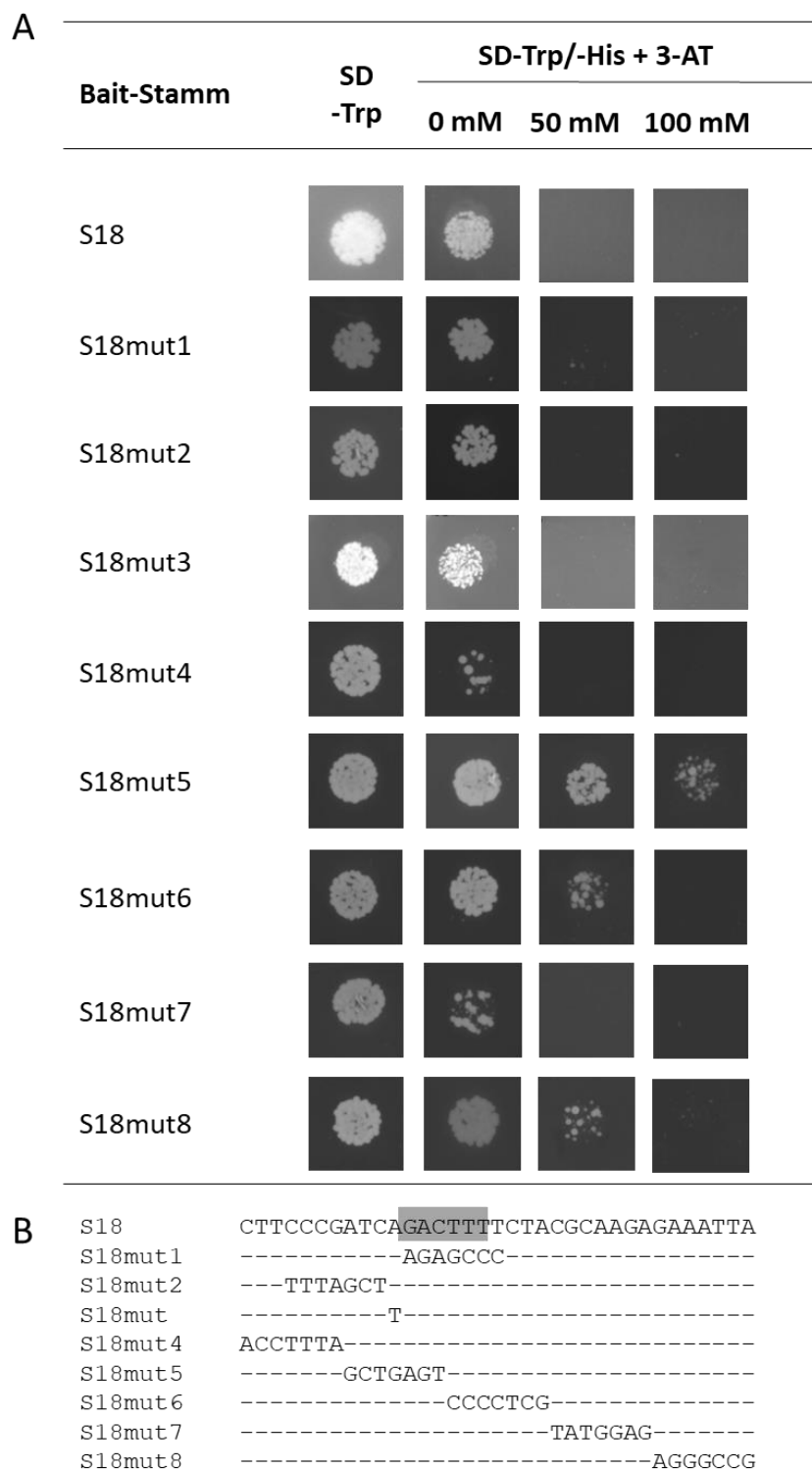


Abbildung 38: Bestimmung der 3-AT Konzentration zur Inhibierung der Hintergrundexpression von *HIS3* in den unterschiedlichen *cis*-Sequenz 18 Bait-Stämmen der Hefe

A: Aufgeführt sind die verschiedenen *cis*-Sequenz 18 Bait-Stämme, die Wachstum bzw. kein Wachstum auf den unterschiedlichen SD-Medien, ohne Tryptophan (-Trp) und Histidin (-His) und verschiedene Konzentrationen (0 – 100 mM) 3-AT enthalten. B: Sequenz 18 und die verschiedenen Mutationen. Veränderte Nukleotide der Mutationen werden gezeigt; unveränderte werden nicht gezeigt (-). Die WT-Box ist grau hinterlegt.

8.4. Ergebnisse des Yeast One-Hybrid Screen

Tabelle 43: Yeast One-Hybrid Screen mit der Mistuda *et al.* (2010) Library und dem *cis*-Sequenz 18 Bait-Stamm

| Nummer | AGI | Name | Familie |
|--------|-----------|---|---------|
| 1 | AT5G08141 | BZIP75 | BZIP |
| 2 | AT1G70510 | KNAT2 | KNAT |
| 3 | - | | |
| 4 | AT1G80840 | WRKY40 | WRKY |
| 5 | AT1G18860 | WRKY61 | WRKY |
| 6 | AT2G04890 | SCL21 | SCL |
| 7 | AT5G40330 | MYB23 | MYB |
| 8 | - | | |
| 9 | AT4G00610 | DNA-binding storekeeper protein-related transcriptional regulator | |
| 10 | At3g61310 | AHL11 | AHL |
| 11 | AT1G54060 | ASIL1 | ASIL |
| 12 | AT1G19790 | SRS7 | SRS |
| 13 | AT5G67190 | DEAR2 | DEAR |
| 14 | - | | |
| 15 | AT1G19040 | | NAC |
| 16 | AT3G23030 | IAA2 | IAA |
| 17 | AT5G60910 | AGL8 | AGL |
| 18 | AT1G20693 | HMGB2 | HMGB |
| 19 | AT1G48150 | | |
| 20 | - | | |

Tabelle 44: Yeast One-Hybrid Screen mit der Mistuda *et al.* (2010) Library und dem S18mut3 Bait-Stamm

| Nummer | AGI | Name | Familie |
|--------|-----------|----------------------------------|---------|
| 1 | AT5G61470 | C2H2-like zinc finger protein | |
| 2 | AT3G54990 | SMZ | |

| | | | |
|-----------|-----------|--------|---------|
| 3 | AT3G15500 | NAC3 | NAC |
| 4 | AT4G25490 | CBF1 | CBF |
| 5 | AT4G31550 | WRKY11 | WRKY |
| 6 | AT1G80840 | WRKY40 | WRKY |
| 7 | AT5G05120 | | |
| 8 | AT4G18450 | | ERF/AP2 |
| 9 | AT2G24670 | DUF313 | |
| 10 | AT3G56400 | WRKY70 | WRKY |
| 11 | AT1G80840 | WRKY40 | WRKY |
| 12 | AT1G80840 | WRKY40 | WRKY |
| 13 | AT3G15500 | NAC3 | NAC |
| 14 | AT2G31220 | BHLH10 | BHLH |
| 15 | AT1G80840 | WRKY40 | WRKY |
| 16 | AT1G80840 | WRKY40 | WRKY |
| 17 | AT3G09230 | MYB1 | MYB |
| 18 | AT1G80840 | WRKY40 | WRKY |
| 19 | AT3G15500 | NAC3 | NAC |
| 20 | AT1G80840 | WRKY40 | WRKY |

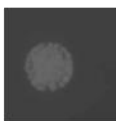



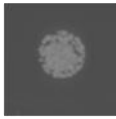



























| Bait | Prey | SD -Trp/-Leu | SD-Trp/-Leu/-His + 3-AT | | |
|-------------------|--------|---|---|--|---|
| | | | 0 mM | 50 mM | 100 mM |
| S18 | WRKY40 |  |  |  |  |
| | WRKY70 |  |  |  |  |
| | WRKY61 |  |  |  |  |
| | WRKY11 |  |  |  |  |
| | NAC |  |  |  |  |
| | NAC3 |  |  |  |  |
| Positiv Kontrolle | |  |  |  |  |
| Negativ Kontrolle | |  |  |  |  |

Abbildung 39: Yeast One-Hybrid Analyse der Retransformation der unterschiedlichen Prey Proteine in dem *cis*-Sequenz 18 Bait-Stamm

Wachstum Hefestämme nach Transformation der unterschiedlichen Prey-Plasmide in dem *cis*-Sequenz 18 Bait-Stamm. Die unterschiedlichen Hefeklonen wurden auf unterschiedlichen SD-Medien ausgebracht. Eine Interaktion zwischen *cis*-Sequenz 18 und den unterschiedlichen Prey Proteinen kann bei Wachstum auf Medium mit einer Konzentration von 50 mM 3-AT beobachtet werden.

8.5. Charakterisierung der stabil transformierten β -Estradiol induzierbaren p65 *Arabidopsis thaliana* Linien

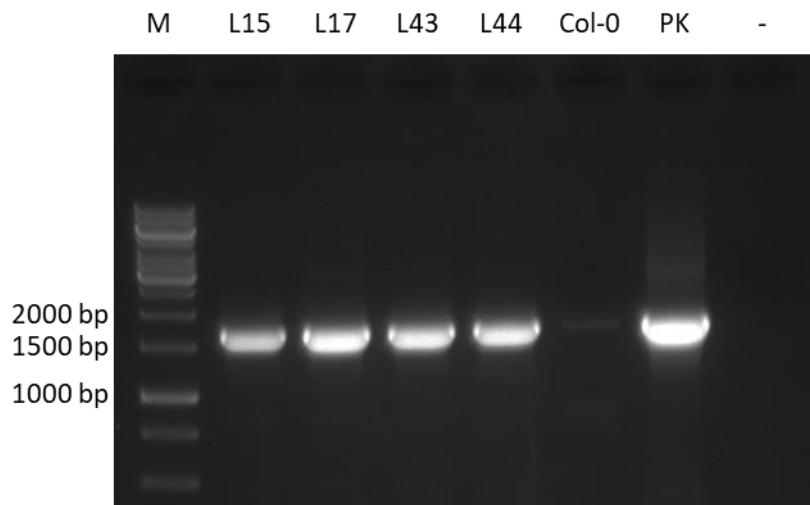


Abbildung 40: Genotypisierung der unterschiedlichen stabil integrierten NF-κB p65 *Arabidopsis thaliana* Linien

Amplifikation von NF-κB p65 in einer PCR mit genomischer DNA als Template. Vier verschiedene Linien (15, 17, 43 und 44) und der NF-κB p65 enthaltende Vektor UBQ10_XVE_MSC_HA_Bar als positive Kontrolle (PK) zeigten ein PCR-Produkt mit einer Größe von ca. 1600 bp. Der Wildtyp Col-0 und die Kontrolle, ohne DNA Template (-), wiesen kein entsprechendes PCR-Produkt auf.

Tabelle 45: Bestimmung der T-DNA Integration der unterschiedlichen stabil transformierten NF-κB p65 *Arabidopsis thaliana* Linien

Nach dem Floral Dip wurden die verschiedenen stabil transformierten Linien weiter kultiviert. Nach Selbstung wird für Linien mit einem T-DNA-Locus eine Segregation von 3:1 (resistent:sensitiv) erwartet. Bei Pflanzen mit zwei T-DNA Loci ein Verhältnis von 15:1 (resistent:sensitiv). Über einen χ^2 -Test wurde die Anzahl der T-DNA-Loci der vier verschiedenen Linien nach folgender Formel überprüft (Freiheitsgrade = 1; $p = 0,95$):

$$\chi^2 = \sum_{j=1}^m \frac{(N_j - n_{oj})^2}{n_{oj}}$$

N_j = beobachtete Anzahl (resistente Pflanzen)

n_{oj} = erwartete Anzahl (resistente Pflanzen)

m = verschiedene Kategorien (resistente bzw. sensitive Pflanzen)

j = Anzahl der Freiheitsgrade (hier 1)

Ist χ^2 größer als 3,84 wurde die Hypothese auf einem Signifikanzniveau von 0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit = 5%) abgelehnt. χ^2 -Werte kleiner 3,84 führten zur Akzeptanz der Hypothese. Angegeben ist die Anzahl der Phosphinotricin-resistenten bzw. sensitiven Pflanzen der T_1 -Generation. Mit – gekennzeichnete Ergebnisse konnten mit dem χ^2 -Test keine akzeptable Hypothese gefunden werden.

| Linie | resistente Pflanzen | sensitive Pflanzen | T-DNA-Loci |
|-------|---------------------|--------------------|------------|
| 15 | 80 | 24 | 1 |
| 17 | 67 | 32 | 1 |
| 43 | 79 | 49 | - |
| 44 | 124 | 32 | 1 |

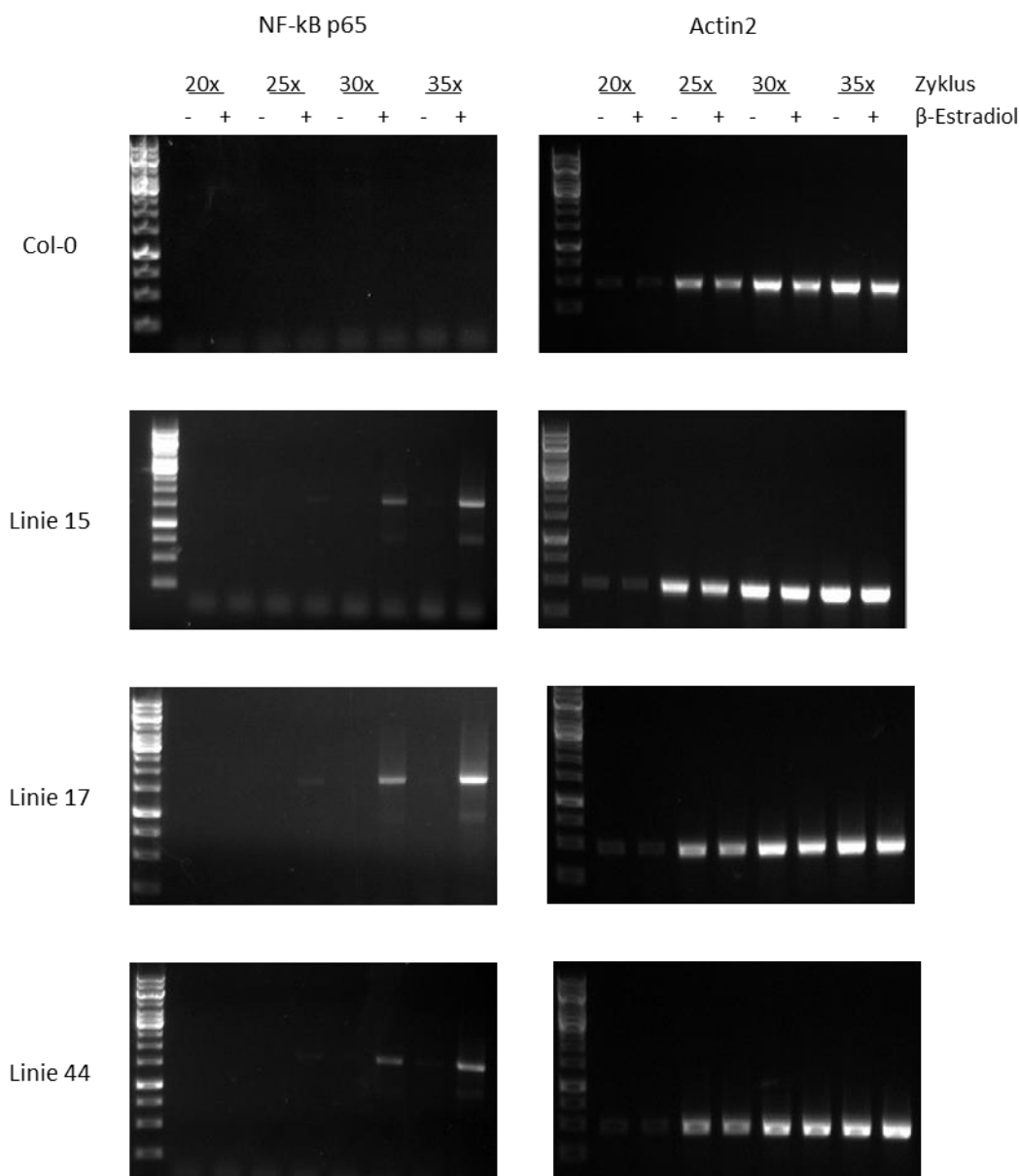


Abbildung 41: Die Transkription von NF-κB p65 ist durch β-Estradiol in stabil transformierten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen induzierbar

Semiquantitative RT-PCR von NF-κB p65 und Actin2. Als Template wurde cDNA von den unterschiedlichen NF-κB p65 stabil transformierten Linien, die für zwei Tage mit β-Estradiol behandelt wurden, verwendet. Nach 25, 30 und 35 Zyklen in der PCR konnte bei der mit β-Estradiol behandelten Proben ein NF-κB p65 Amplifikat bei den stabil transformierten Linien beobachtet werden. Actin2 diente als Kontrolle.

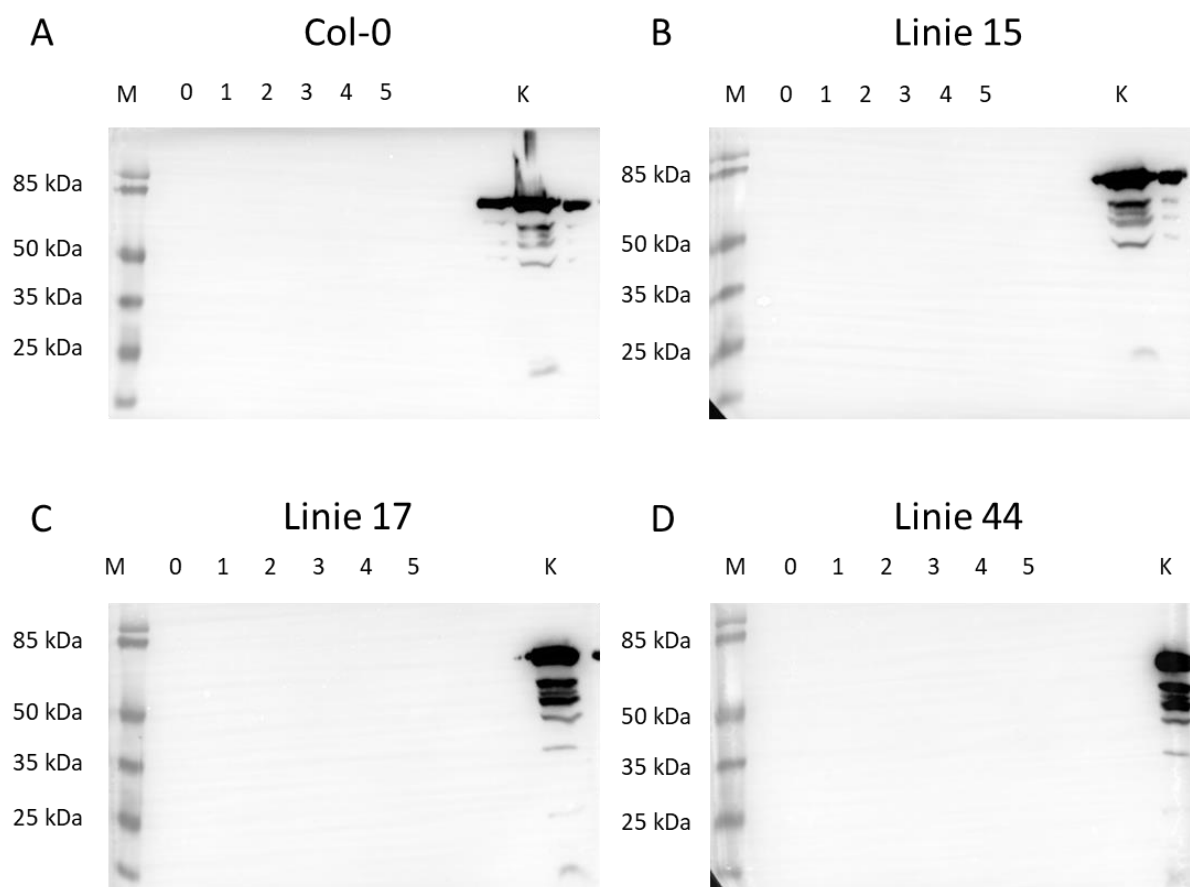
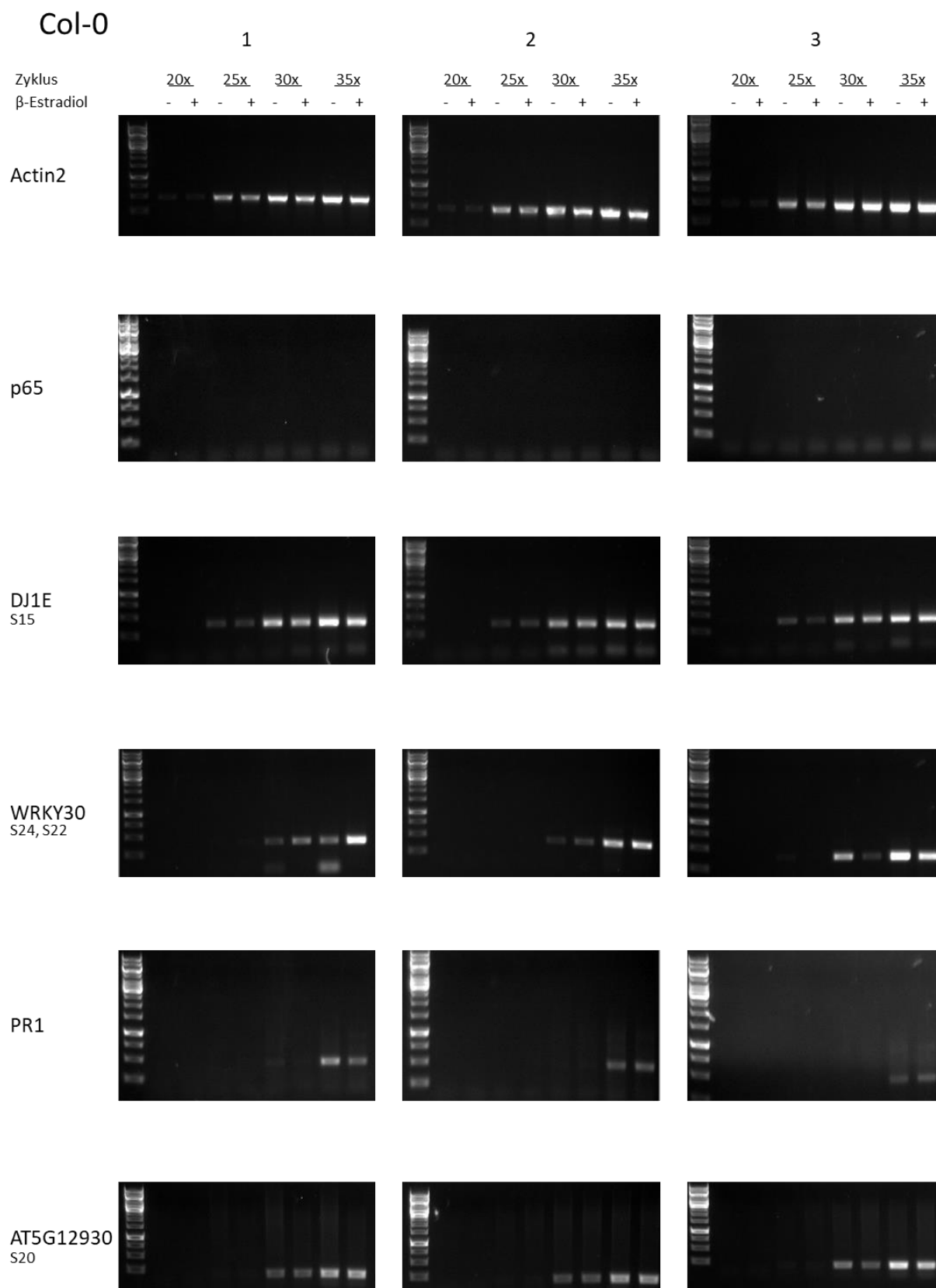
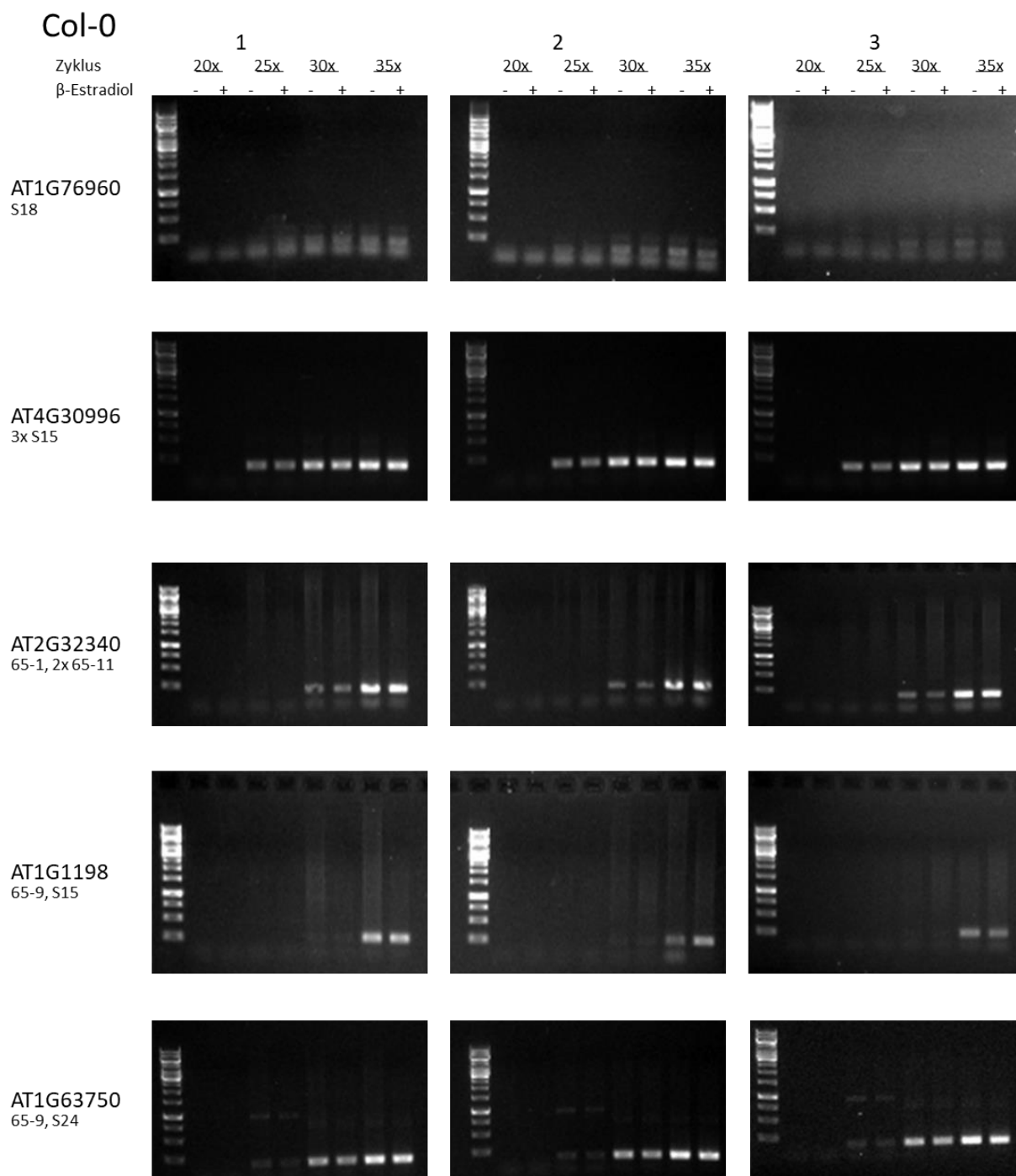


Abbildung 42: Western Blot Analyse der verschiedenen NF-κB p65 stabil transformierten *Arabidopsis thaliana* Linien

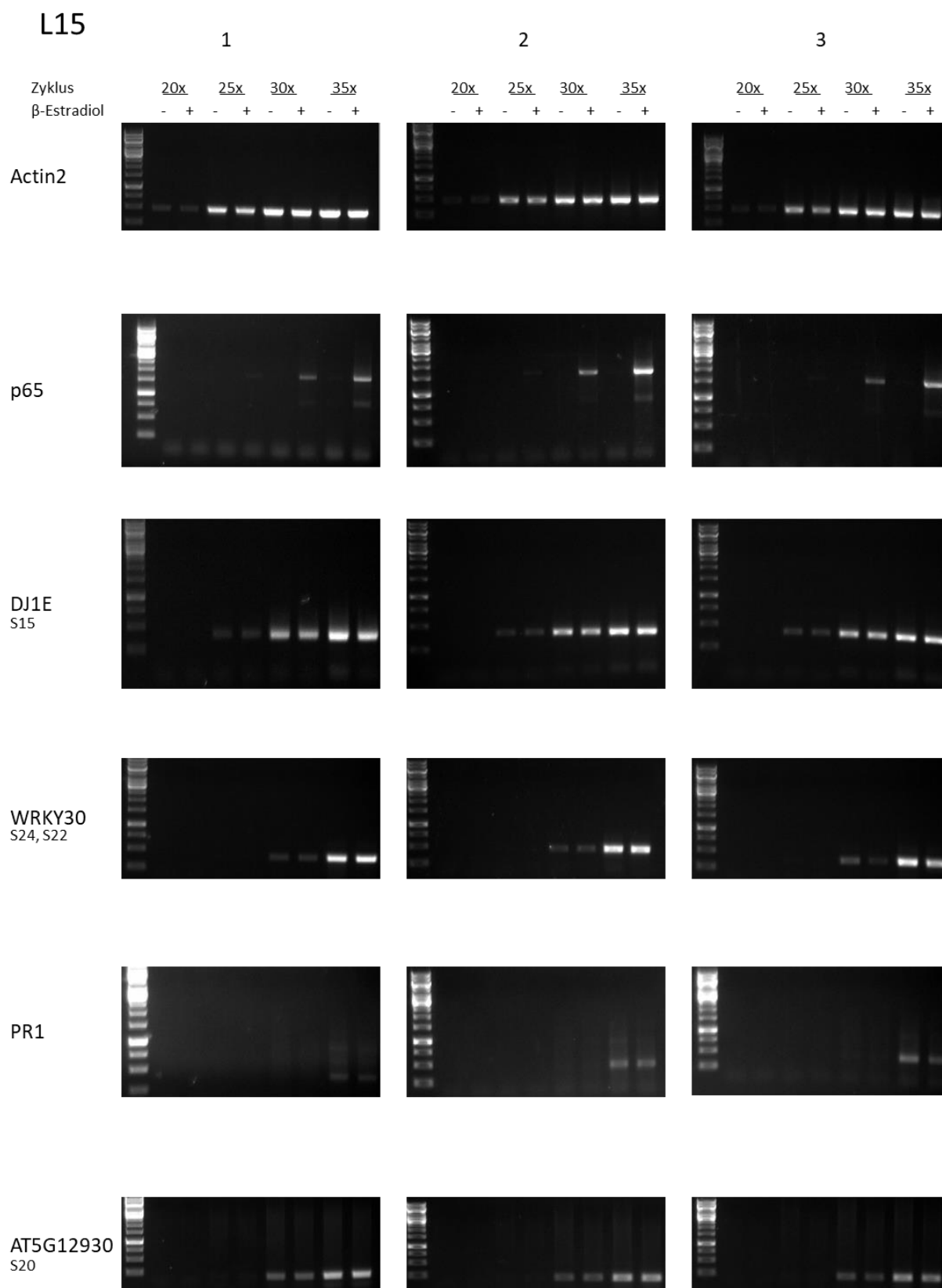
Die drei unterschiedlichen NF-κB p65 Linien und der Wildtyp (Col-0) wurden bis zu 5 Tage mit β -Estradiol behandelt. Zu den unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proben genommen. Zu keinem Zeitpunkt konnte ein Signal detektiert werden. Nur die Kontrolle (K) zeigte ein entsprechendes Signal. Verwendet wurde der Anti-NF-κB Antikörper. Das gleiche Ergebnis wurde mit dem HA-Antikörper erzielt (nicht gezeigt).



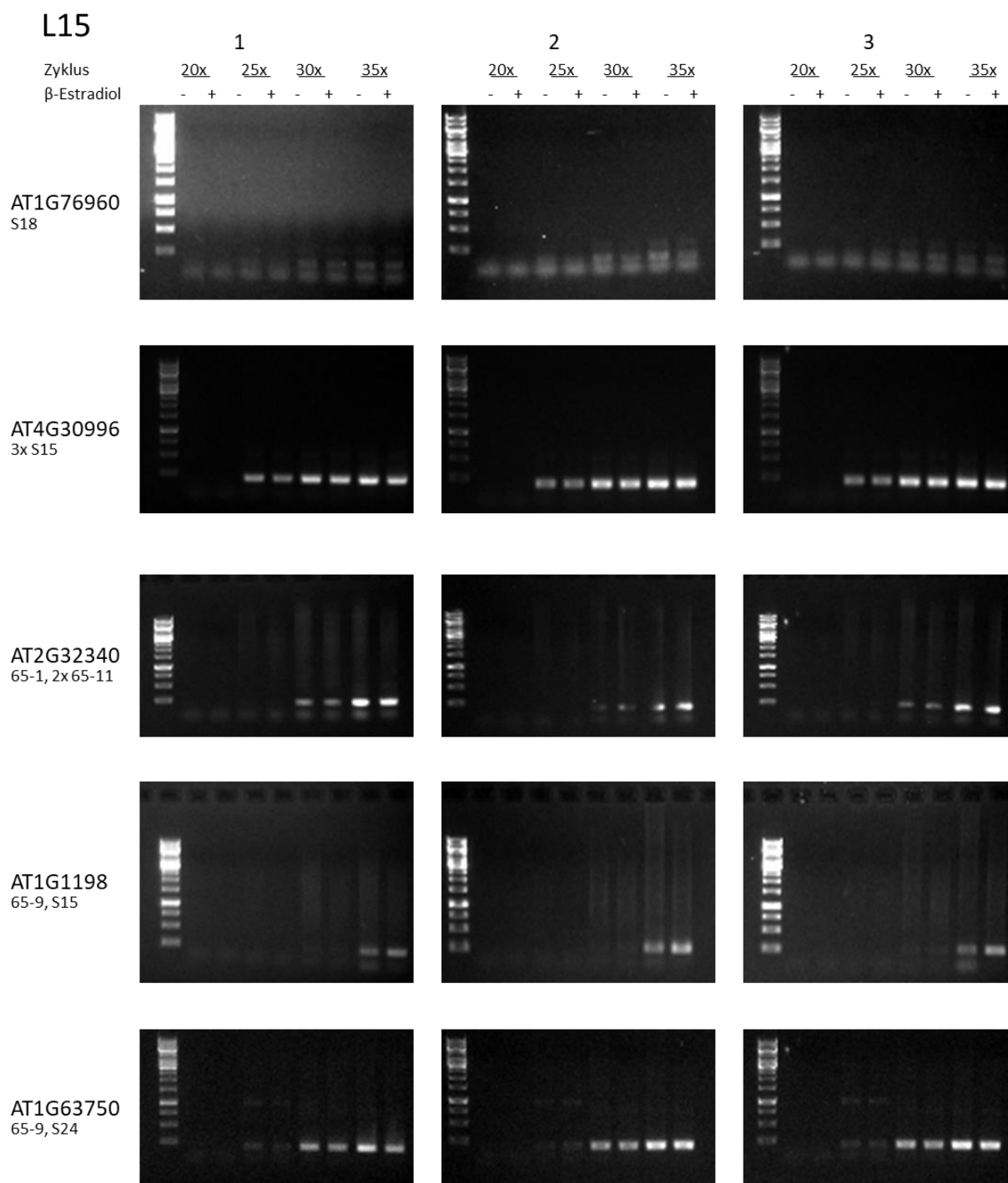
Fortsetzung der Abbildung 43 auf der nächsten Seite.



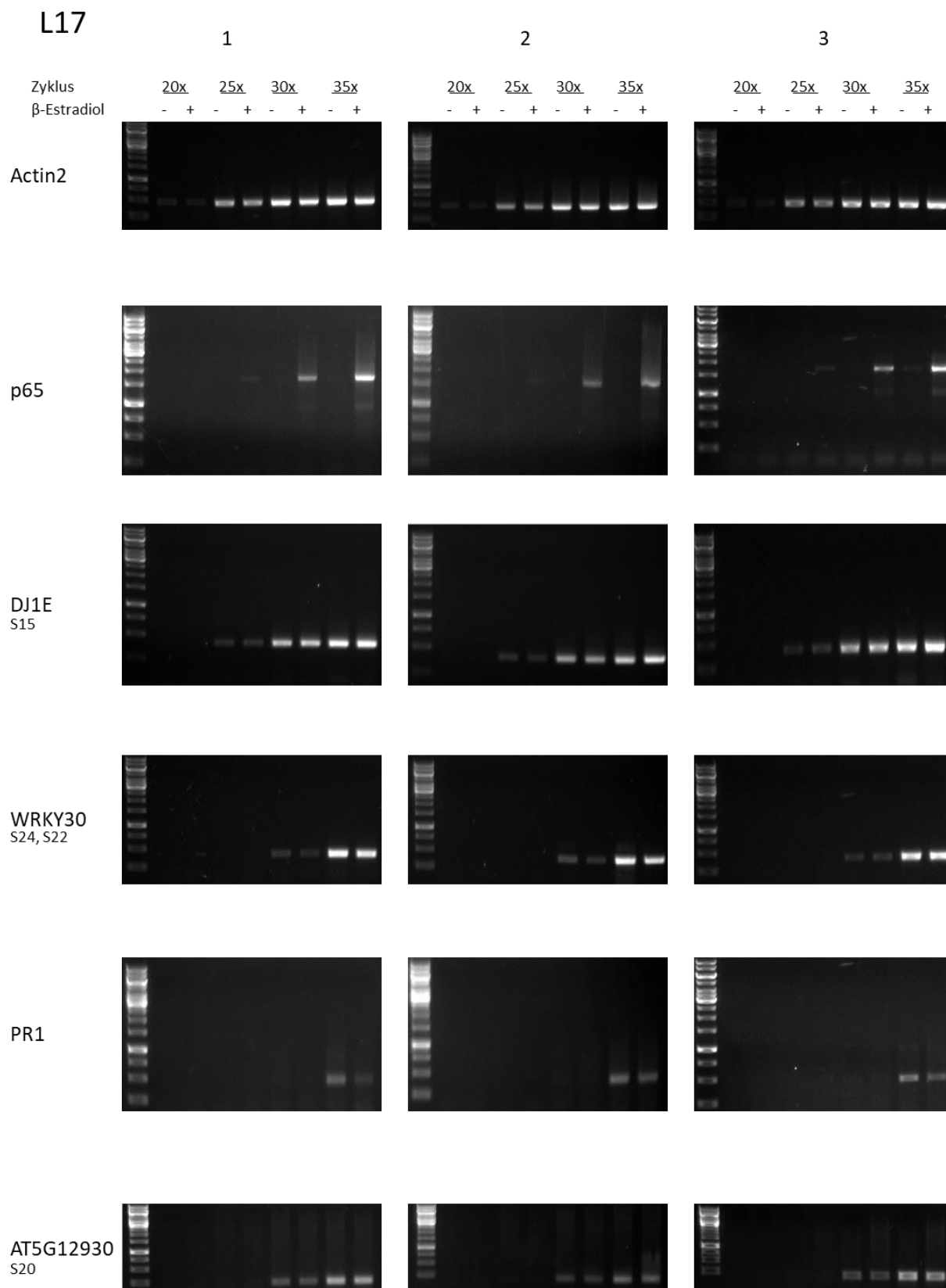
Fortsetzung der Abbildung 43 auf der nächsten Seite.



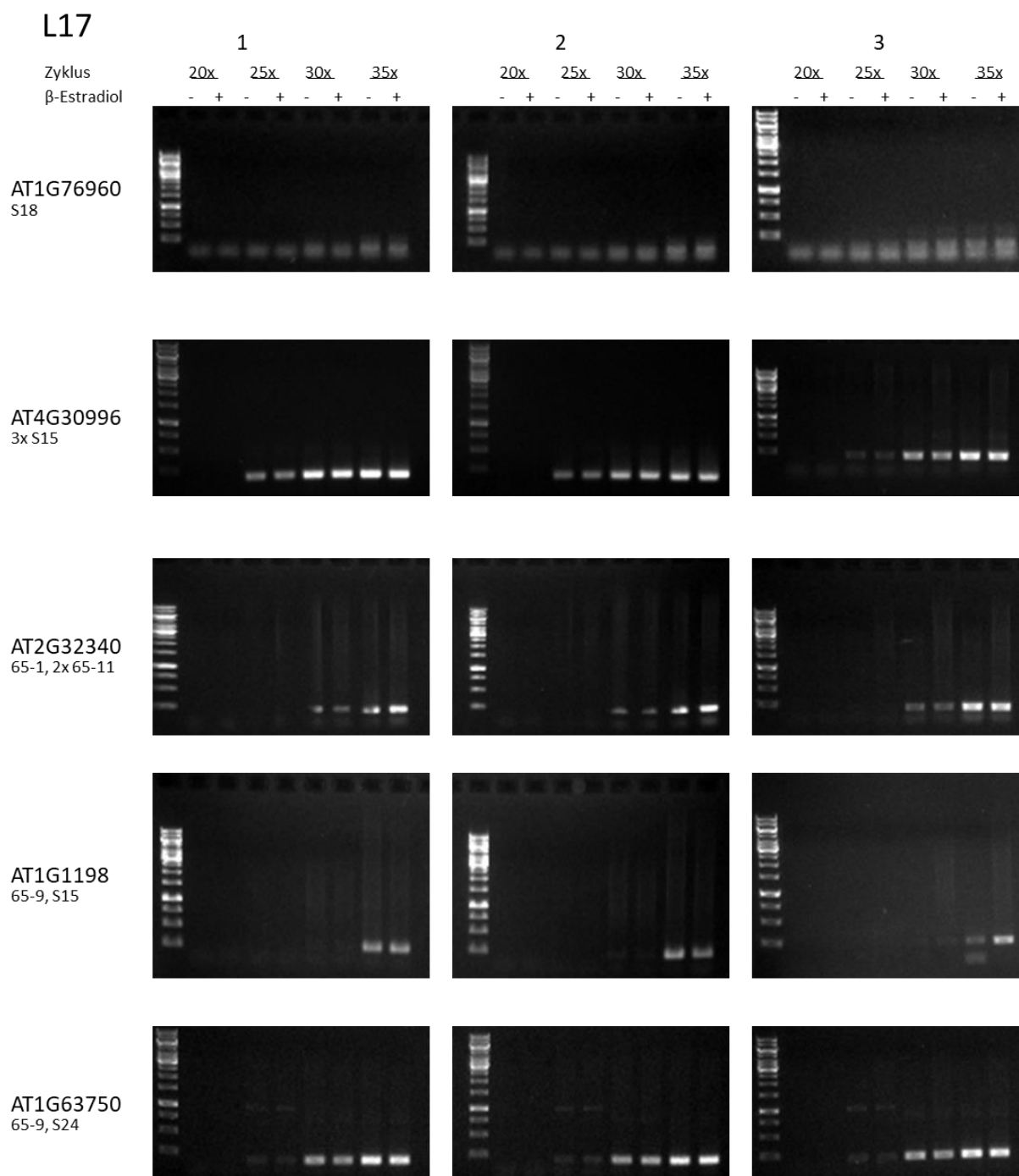
Fortsetzung der Abbildung 43 auf der nächsten Seite.



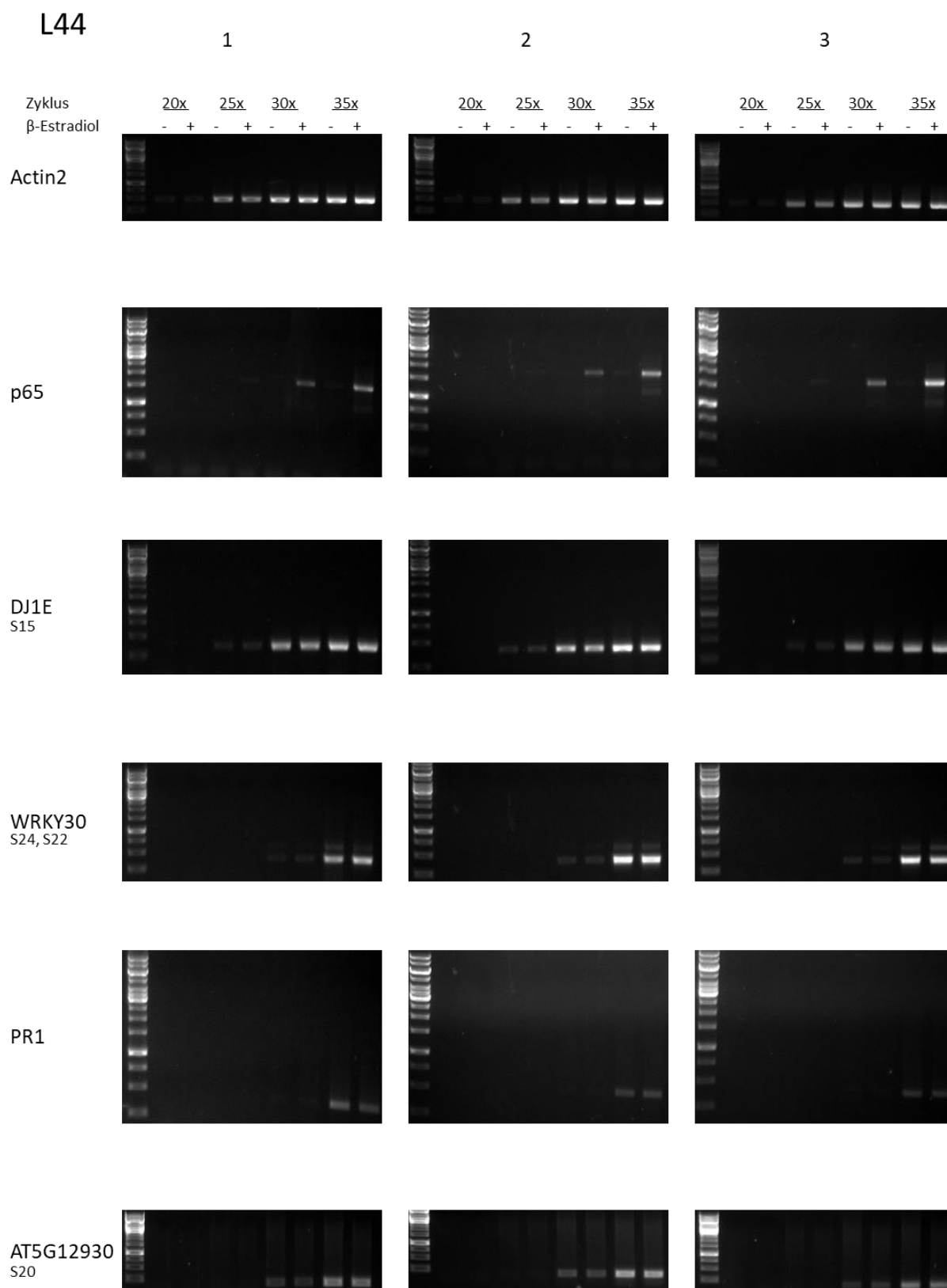
Fortsetzung der Abbildung 43 auf der nächsten Seite.



Fortsetzung der Abbildung 43 auf der nächsten Seite.



Fortsetzung der Abbildung 43 auf der nächsten Seite.



Fortsetzung der Abbildung 43 auf der nächsten Seite.

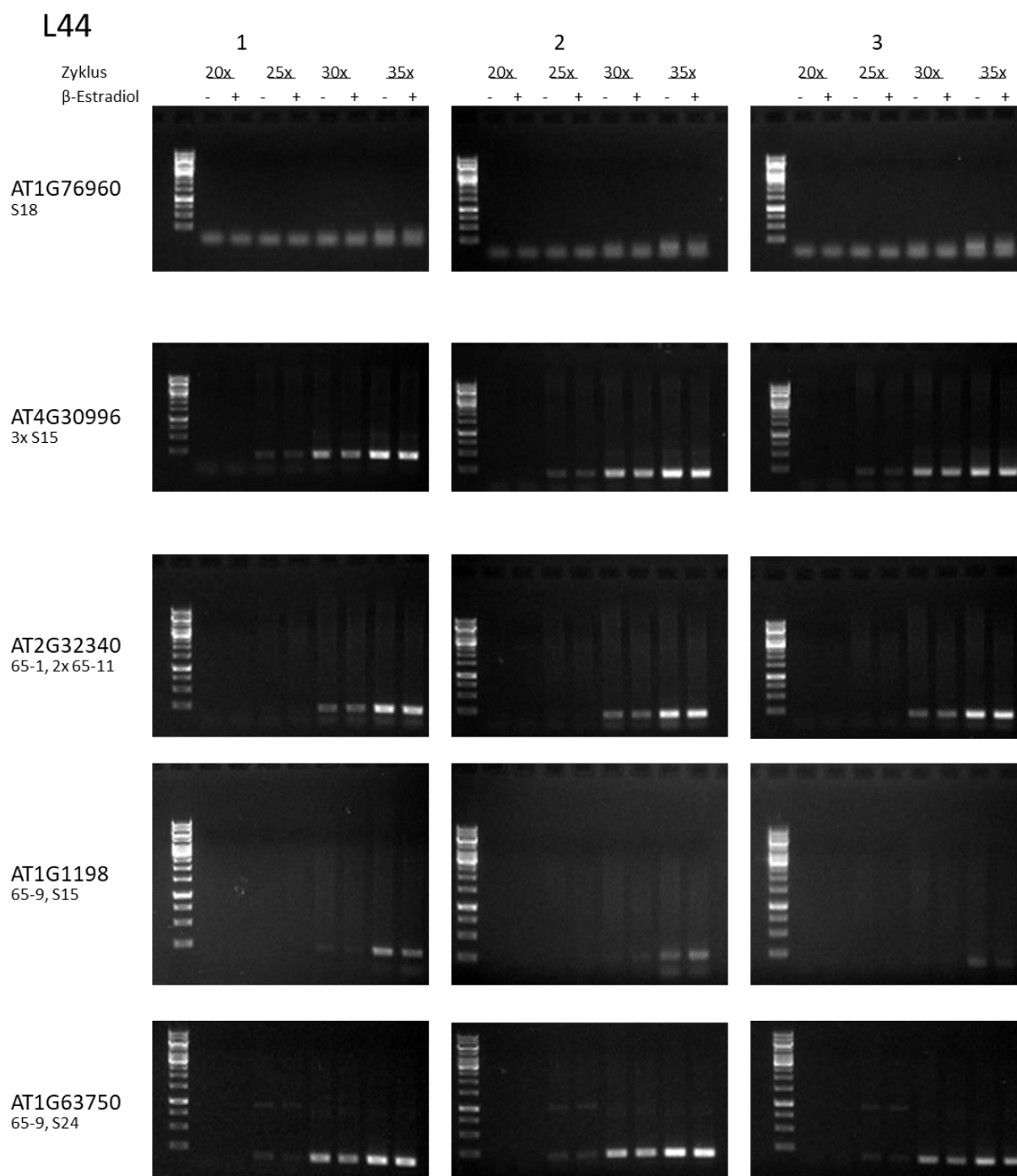


Abbildung 43: Semiquantitative RT-PCR potentieller NF-κB p65 regulierter Zielgene aus β-Estradiol behandelten stabil transformierten NF-κB p65 *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Semiquantitative RT-PCR der potentiellen NF-κB p65 regulierten Zielgenen β-Estradiol behandelten (+) bzw. unbehandelten (-) stabil transformierten NF-κB p65 Linien (L15, L17 und L44). Drei biologische Replikate wurden durchgeführt (1, 2 und 3). Die AGI der entsprechenden Gene, sowie die NF-κB p65 Bindestellen bzw. WT-Box enthaltenden *cis*-Sequenzen nach Kusch *et al* (1992) und Koschmann *et al.* (2012) sind angegeben. Nach 20, 25, 30 und 35 Zyklen wurden entsprechende Proben aus den PCR-Ansätzen entnommen und analysiert. Actin2 und p65 dienen als Kontrollen. Keins der potentiellen NF-κB p65 Zielgenen zeigte nach β-Estradiol Behandlung eine gesteigerte Expression in den unterschiedlichen stabil transformierten Linien.

8.6. Aufreinigung der *E. coli* exprimierten Proteine

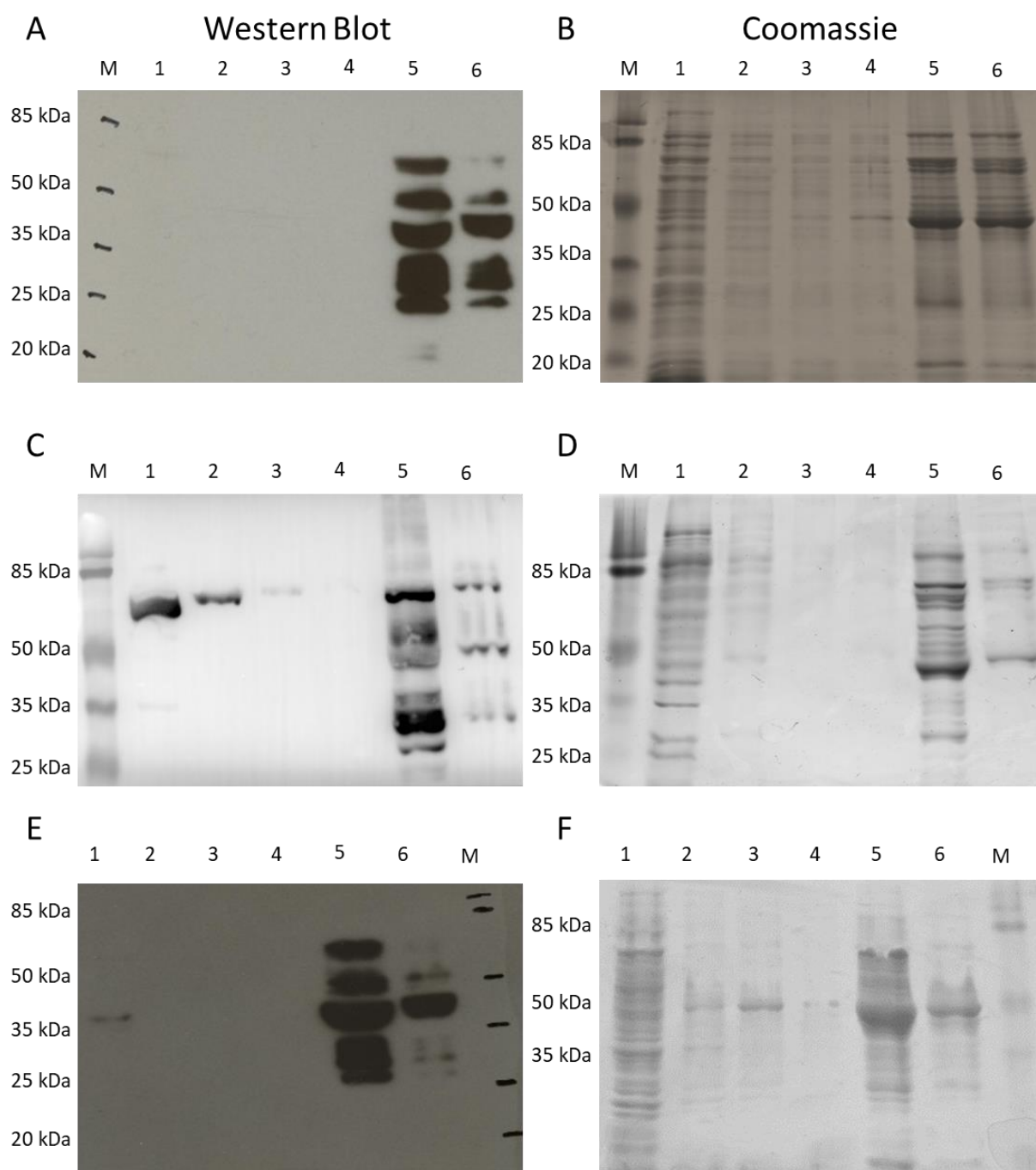


Abbildung 44: Aufreinigungen von *E. coli* exprimiertem NF-κB p65

Western Blot (A, C und E) und Coomassie (B, D und F) Analyse von zwei *E. coli* NF-κB p65 Aufreinigungen. Aufreinigung 1: A und C. Aufreinigung 2: C und D. Aufreinigung 3: E und F. M: Proteinmarker. 1: Proteinextrakt nach der Inkubation auf der „Chelating Sepharose Fast Flow“. 2 bis 4: verschiedene Waschfraktionen. 5: erste Elution. 6: zweite Elution.

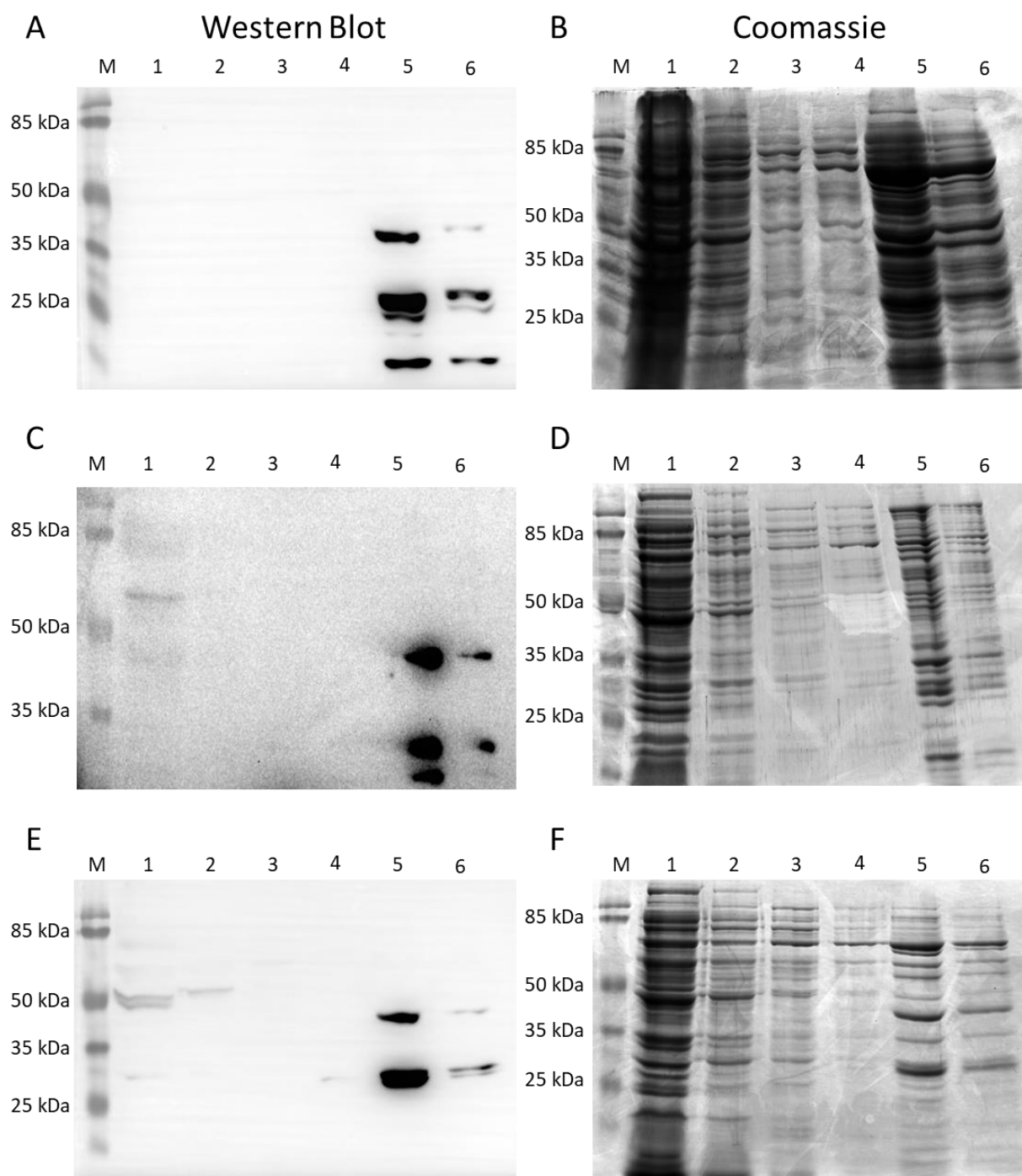
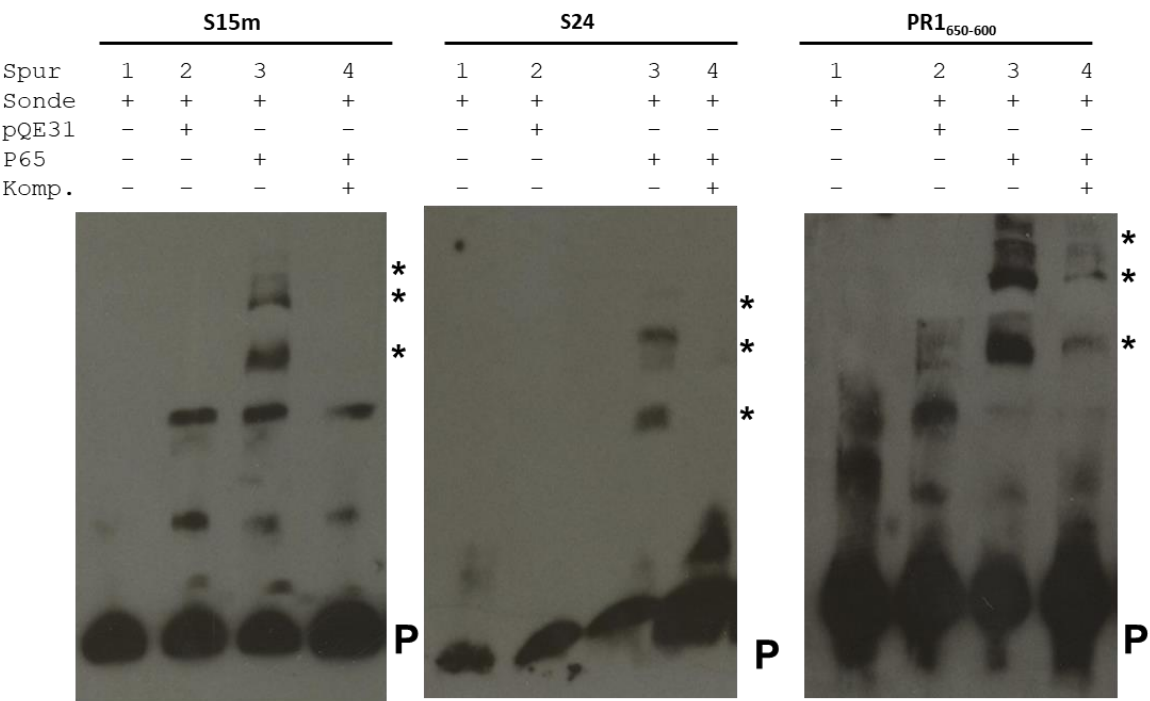


Abbildung 45: Aufreinigung von *E. coli* exprimiertem WRKY26

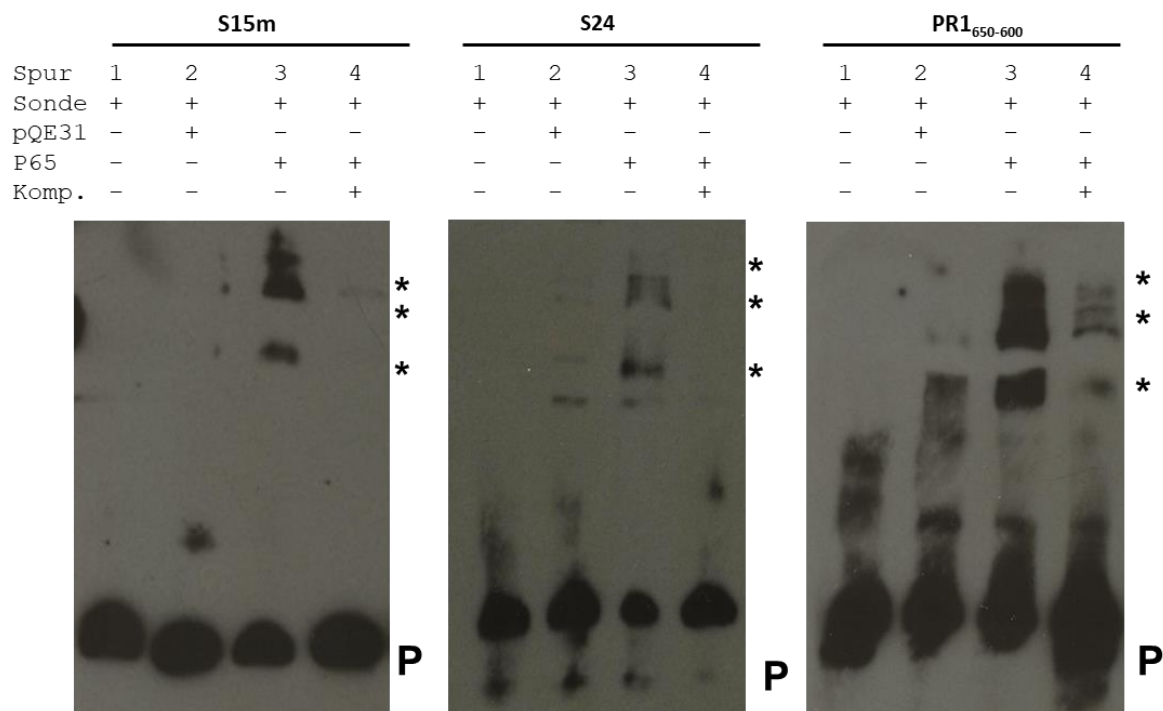
Western Blot (A + C + E) und Coomassie (B + D + F) Analyse von drei *E. coli* NF-κB p65 Aufreinigungen. Aufreinigung 1: A und C. Aufreinigung 2: C und D. Aufreinigung 3: E und F. M: Proteinmarker. 1: Proteinextrakt nach der Inkubation auf der „Chelating Sepharose Fast Flow“. 2 bis 4: verschiedene Waschfraktionen. 5: erste Elution. 6: zweite Elution.

8.7. Unabhängige Wiederholungen der EMSA Experimente



S15m AGGACTTTTCACCAGTTGGACTTTGGGATTGTTGG
S24 TGGTCAGCATGTTGGACTTTCCAAATTCATTGACC
PR1₆₅₀₋₆₀₀ TACTTACGTCATAGATGTGGCGGCATATATTCTTCAGGACTTTTCAGCCAT

Abbildung 46: Unabhängige Wiederholung des EMSAs mit NF-κB p65 und den cis-Sequenzen 15, 24 und PR1₆₅₀₋₆₀₀
Über den einzelnen Experimenten sind die Sequenzen angegeben, welche als Sonden und Kompetitoren verwendet wurden. 1: markierte Sonde. 2: markierte Sonde mit aufgereinigtem Proteinextrakt aus *E. coli*, welcher kein NF-κB p65 exprimiert. 3: markierte Sonde mit aufgereinigtem NF-κB p65. 4: markierte Sonde mit aufgereinigtem NF-κB p65 und unmarkierter Kompetitor-DNA in 500x molarem Überschuss. Mit P ist die Position der markierten Sonde markiert. * zeigt die spezifischen DNA-Protein Komplexe an. Die Sequenzen S15m, S24 und PR1₆₅₀₋₆₀₀ sind aufgeführt.



S15m AGGACTTTTCACCAAGTTGGACTTTGGGATTGTTGG
 S24 TGGTCAGCATGTTGGACTTTCCAAATTCATTGACC
 PR1₆₅₀₋₆₀₀ TACTTACGTCATAGATGTGGCGGCATATATTCTTCAGGACTTTTCAGCCAT

Abbildung 47: Zweite unabhängige Wiederholung des EMSAs mit NF-κB p65 und den *cis*-Sequenzen 15, 24 und PR1₆₅₀₋₆₀₀
 Über den einzelnen Experimenten sind die Sequenzen angegeben, welche als Sonden und Kompetitor verwendet wurden. 1: markierte Sonde. 2: markierte Sonde mit aufgereinigtem Proteinextrakt aus *E. coli*, welcher kein NF-κB p65 exprimiert. 3: markierte Sonde mit aufgereinigtem NF-κB p65. 4: markierte Sonde mit aufgereinigtem NF-κB p65 und unmarkierter Kompetitor-DNA in 500x molarem Überschuss. Mit P ist die Position der markierten Sonde markiert. * zeigt die spezifischen DNA-Protein Komplexe an. Die Sequenzen S15m, S24 und PR1₆₅₀₋₆₀₀ sind aufgeführt.

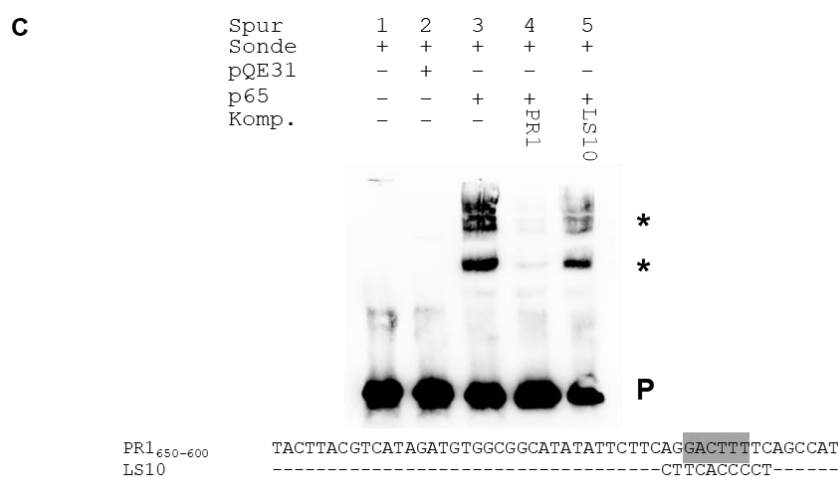
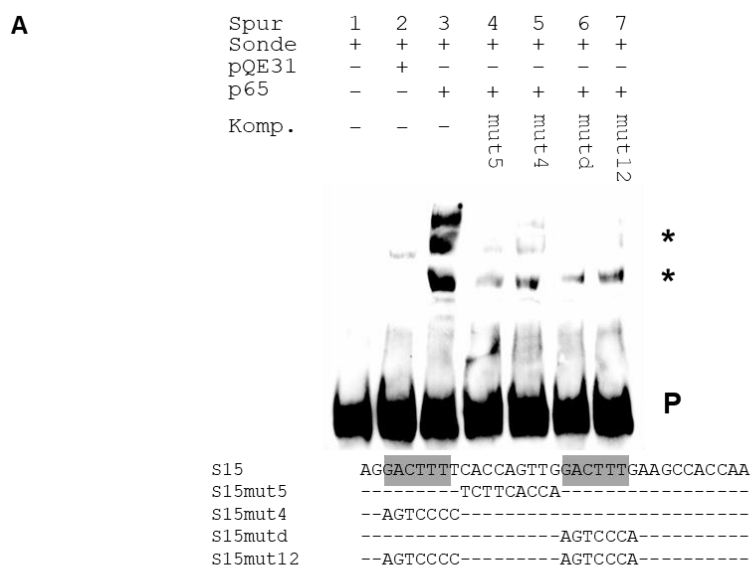


Abbildung 48: Unabhängige Wiederholung des EMSAs mit NF-κB p65 und den Sequenzen 15, 24 und PR1₆₅₀₋₆₀₀

EMSA mit NF-κB p65 und Biotin-markierter *cis*-Sequenz 15 (A) 24 (B) und PR1₆₅₀₋₆₀₀ (C) als Sonde. 1: markierte Sonde. 2: markierte Sonde mit aufgereinigtem Proteinextrakt aus *E. coli*, welcher kein NF-κB p65 exprimiert. 3: markierte Sonde mit aufgereinigtem NF-κB p65. 4 – 7: markierte Sonde mit aufgereinigtem NF-κB p65 und verschiedenen Sequenzen als unmarkierter Kompetitor in 2000x molarem Überschuss. Mit P ist die Position der markierten Sonde markiert. * zeigt die spezifischen DNA-Protein Komplexe an. Die Sequenzen und entsprechende verschiedenen Mutationen der Sequenz sind aufgeführt. Veränderte Nukleotide der Mutationen werden gezeigt; unveränderte werden nicht gezeigt (-). Die W-Boxen (GGTCA und TTGACC) sind unterstrichen und die WT-Boxen (GACTTT) sind grau hinterlegt.

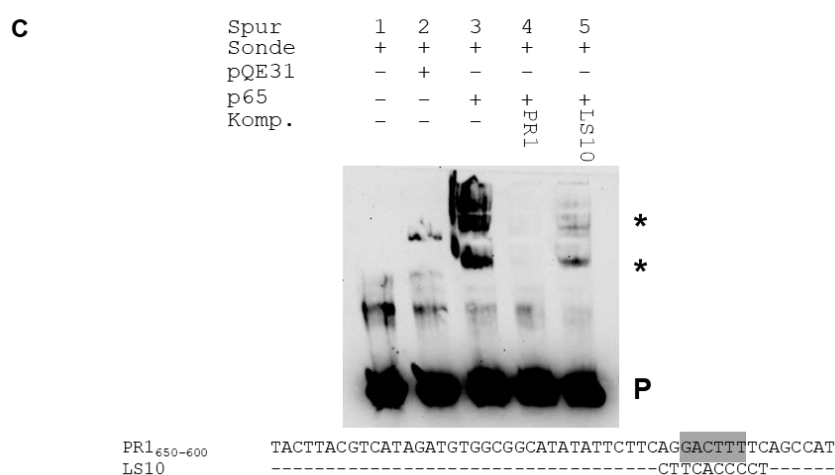
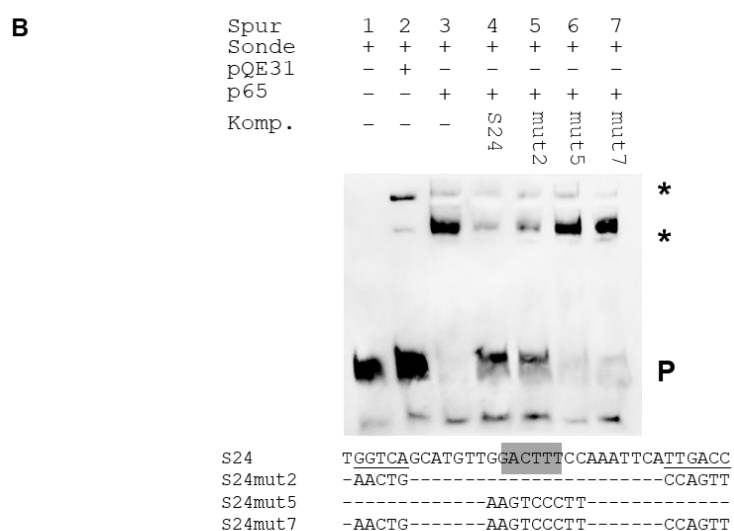
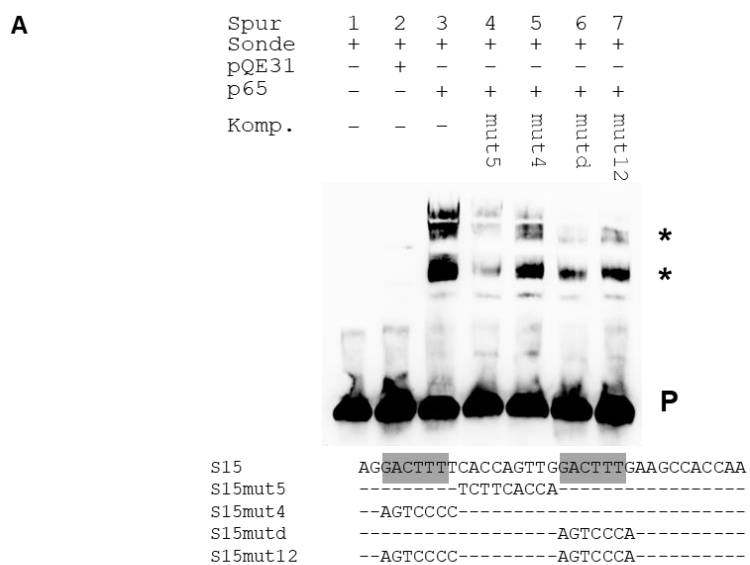


Abbildung 49: Zweite unabhängige Wiederholung des EMSAs mit NF- κ B p65 und den Sequenzen 15, 24 und PR1₆₅₀₋₆₀₀
 EMSA mit NF- κ B p65 und Biotin-markierter *cis*-Sequenz 15 (A) 24 (B) und PR1₆₅₀₋₆₀₀ (C) als Sonde. 1: markierte Sonde. 2: markierte Sonde mit aufgereinigtem Proteinextrakt aus *E. coli*, welcher kein NF- κ B p65 exprimiert. 3: markierte Sonde mit aufgereinigtem NF- κ B p65. 4–7: markierte Sonde mit aufgereinigtem NF- κ B p65 und verschiedenen Sequenzen als unmarkierter Kompetitor in 2000x molarem Überschuss. Mit P ist die Position der markierten Sonde markiert. * zeigt die spezifischen DNA-Protein Komplexe an. Die Sequenzen und entsprechende verschiedenen Mutationen der Sequenz sind aufgeführt. Veränderte Nukleotide der Mutationen werden gezeigt; unveränderte werden nicht gezeigt (-). Die W-Boxen (GGTCA und TTGACC) sind unterstrichen und die WT-Boxen (GACTTT) sind grau hinterlegt.

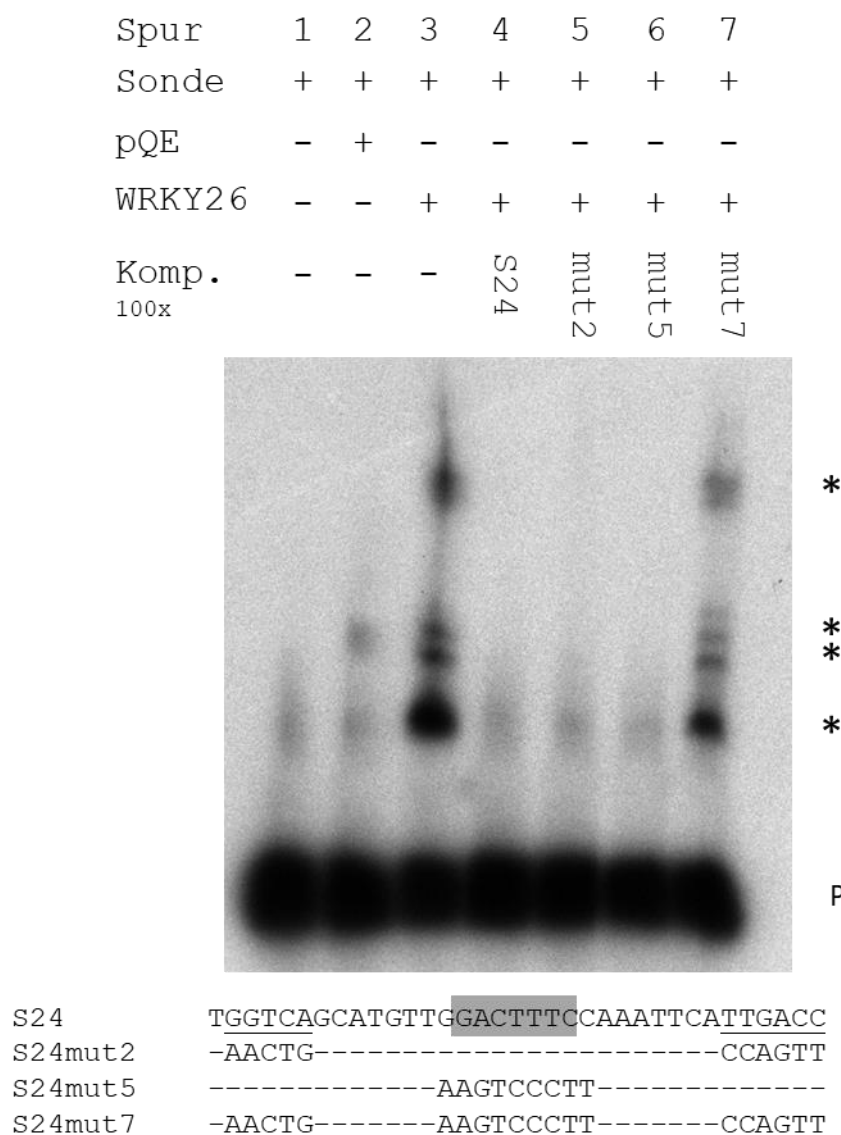


Abbildung 50: Unabhängige Wiederholung des EMSAs mit WRKY26 und der radioaktiv markierten *cis*-Sequenz 24 als Sonde
 1: markierte Sonde. 2: markierte Sonde mit aufgereinigtem Proteinextrakt aus *E. coli*, welcher kein WRKY26 exprimiert. 3: markierte Sonde mit aufgereinigtem WRKY26. 4: markierte Sonde mit aufgereinigtem WRKY26 und Sequenz 24 als unmarkierter Kompetitor in 100x molarem Überschuss. 5: markierte Sonde mit aufgereinigtem WRKY26 und S24mut2 als unmarkierter Kompetitor in 100x molarem Überschuss. 6: markierte Sonde mit aufgereinigtem WRKY26 und S24mut5 als unmarkierter Kompetitor in 100x molarem Überschuss. 7: markierte Sonde mit aufgereinigtem WRKY26 und S24mut7 als unmarkierter Kompetitor in 100x molarem Überschuss. Mit P ist die Position der markierten Sonde markiert. * zeigt die spezifischen DNA-Protein Komplexe an. Die Sequenz 24 und die drei verschiedenen Mutationen der *cis*-Sequenz sind aufgeführt. Veränderte Nukleotide der Mutationen werden gezeigt; unveränderte werden nicht gezeigt (-). Die W-Boxen (GGTCA und TTGACC) sind unterstrichen und die WT-Box (GACTTT) ist grau hinterlegt.

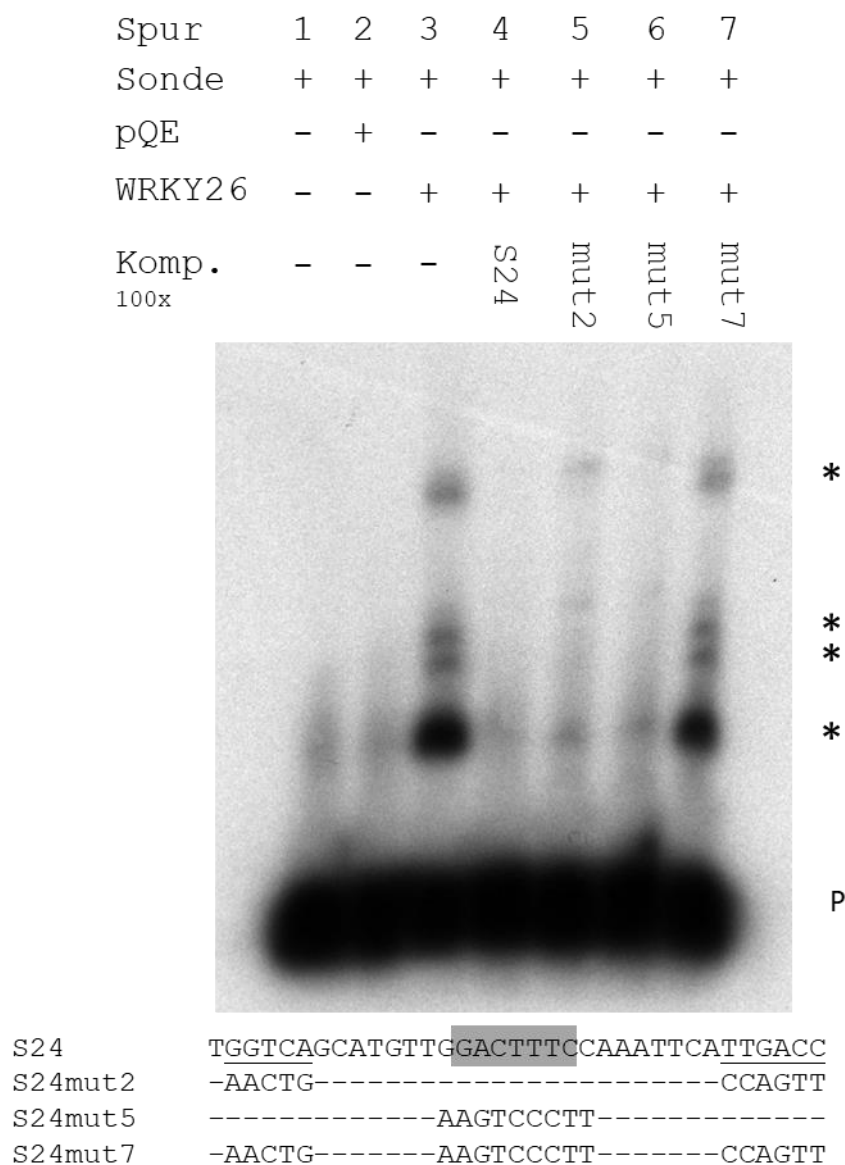


Abbildung 51: Zweite unabhängige Wiederholung des EMSAs mit WRKY26 und der radioaktiv markierten *cis*-Sequenz 24 als Sonde

1: markierte Sonde. 2: markierte Sonde mit aufgereinigtem Proteinextrakt aus *E. coli*, welcher kein WRKY26 exprimiert. 3: markierte Sonde mit aufgereinigtem WRKY26. 4: markierte Sonde mit aufgereinigtem WRKY26 und Sequenz 24 als unmarkierter Kompetitor in 100x molarem Überschuss. 5: markierte Sonde mit aufgereinigtem WRKY26 und S24mut2 als unmarkierter Kompetitor in 100x molarem Überschuss. 6: markierte Sonde mit aufgereinigtem WRKY26 und S24mut5 als unmarkierter Kompetitor in 100x molarem Überschuss. 7: markierte Sonde mit aufgereinigtem WRKY26 und S24mut7 als unmarkierter Kompetitor in 100x molarem Überschuss. Mit P ist die Position der markierten Sonde markiert. * zeigt die spezifischen DNA-Protein Komplexe an. Die Sequenz 24 und die drei verschiedenen Mutationen der *cis*-Sequenz sind aufgeführt. Veränderte Nukleotide der Mutationen werden gezeigt; unveränderte werden nicht gezeigt (-). Die W-Boxen (GGTCA und TTGACC) sind unterstrichen und die WT-Box (GACTTT) ist grau hinterlegt.

9. Materialliste

9.1. Glycerinkulturen und DNA-Konstrukte

Tabelle 46: Auflistung der verwendeten und erstellten DNA-Konstrukte und Glycerinkulturen in Bakterien

| Glycerin | DNA | Name | Beschreibung |
|----------|------|------------------------------|---|
| 4964 | | XL1 Blue MRF' | <i>E. coli</i> Stamm zur Klonierung von DNA-Konstrukten. Resistenz Tetracyclin |
| 4965 | | BL21 | <i>E. coli</i> Stamm zur Überexpression von Proteinen |
| 4935 | | Rosetta Blue | <i>E. coli</i> Stamm zur Überexpression von Proteinen. Enthält das Plasmid pRARE für seltene tRNAs. Resistenz Chloramphenicol und Tetracycline |
| 4067 | | <i>A. tumefaciens</i> C58C1 | <i>A. tumefaciens</i> Stamm zum Transfer von T-DNAs in Pflanzen. Resistenz Carbenicillin und Rifampicin |
| 4946 | 7484 | pORE_O2_d35S_pA | Pflanzlicher Expressionsvektor pORE_O2_d35S_pA in XL1 Blue MRF'. Resistenz Kanamycin |
| 4934 | 7475 | p65-pORE | cDNA des Maus NFκB p65 Transkriptionsfaktor in pORE_O2_d35S_pA in XL1 Blue MRF'. Resistenz Kanamycin |
| 4960 | 7502 | SV40-p65-pORE | Fusionsprotein SV40-p65 in pORE_O2_d35S_pA. Das Zellkernlokalisierungssignal (NLS) von SV40 wurde N-terminal an den Maus NFκB p65 Transkriptionsfaktor kloniert in XL1 Blue MRF'. Resistenz Kanamycin |
| 4961 | 7503 | GAL4AD-p65-pORE (ohne SV40) | Fusionsprotein GAL4AD-p65 (ohne SV40 Zellkernlokalisierungssignal) in pORE_O2_d35S_pA in XL1 Blue MRF'. Resistenz Kanamycin |
| 4890 | 7411 | SV40-Gal4AD-p65-pORE | Fusionsprotein aus dem Zellkernlokalisierungssignal von SV40, der Aktivierungsdomäne Gal4AD und NFκB p65 Transkriptionsfaktor in pORE_O2_d35S_pA in XL1 Blue MRF'. Resistenz Kanamycin |
| 4648 | | WRKY26-pORE | cDNA von WRKY26 in pORE_O2_d35S_pA in XL1 Blue MRF'. Resistenz Kanamycin |
| 4649 | | WRKY40-pORE | cDNA von WRKY40 in pORE_O2_d35S_pA in XL1 Blue MRF'. Resistenz Kanamycin |
| 4650 | | WRKY41-pORE | cDNA von WRKY41 in pORE_O2_d35S_pA in XL1 Blue MRF'. Resistenz Kanamycin |
| 5023 | 7589 | WRKY26-pORE | cDNA von WRKY26 in pORE_O2_d35S_pA in XL1 Blue MRF'. Resistenz Kanamycin |
| 5024 | 7590 | WRKY41-pORE | cDNA von WRKY41 in pORE_O2_d35S_pA in XL1 Blue MRF'. Resistenz Kanamycin |
| 5009 | 7579 | WRKY26AD-pORE | Fusionsprotein WRKY26AD in pORE_O2_pA in XL1 Blue MRF'. Resistenz Kanamycin |
| 5010 | 7580 | WRKY41AD-pORE | Fusionsprotein WRKY41AD in pORE_O2_pA in XL1 Blue MRF'. Resistenz Kanamycin |
| 4511 | 6917 | pBT10GUS-d35S-LUC | Reportergenvektor pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 3826 | 5766 | 4xD-pBT10GUS_d35S-LUC | Tetramer des D-Elements in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 3833 | 5773 | 4xS15-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 15 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4715 | 7148 | 4xS15mut4-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 15mut4 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4716 | 7149 | 4xS15mut5-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 15mut5 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4554 | 7018 | 4xS15mutd-pBT10GUS-d35SLUC | Tetramer von Sequenz 15mutd in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4733 | 7160 | 4xS15mut12-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 15mut12 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 3831 | 5771 | 4xS18-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 18 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4941 | 7480 | 1xS18mut1-pBT10GUS-d35S-LUC | Momer von Sequenz 18mut1 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4947 | 7485 | 2xS18mut1-pBT10GUS-d35S-LUC | Dimer von Sequenz 18mut1 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4948 | 7486 | 4xS18mut1-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 18mut1 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4942 | 7481 | 1xS18mut2-pBT10GUS-d35S-LUC | Momer von Sequenz 18mut2 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4949 | 7487 | 2xS18mut2-pBT10GUS-d35S-LUC | Dimer von Sequenz 18mut2 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4950 | 7488 | 4xS18mut2-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 18mut2 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |

| | | | |
|------|------|------------------------------|---|
| 5043 | 7604 | 1xS18mut3-pBT10GUS-d35S-LUC | Momer von Sequenz 18mut3 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5044 | 7605 | 2xS18mut3-pBT10GUS-d35S-LUC | Dimer von Sequenz 18mut3 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5045 | 7606 | 4xS18mut3-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 18mut3 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5048 | 7612 | 1xS18mut4-pBT10GUS-d35S-LUC | Momer von Sequenz 18mut4 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5049 | 7613 | 2xS18mut4-pBT10GUS-d35S-LUC | Dimer von Sequenz 18mut4 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5050 | 7614 | 4xS18mut4-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 18mut4 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5051 | 7615 | 1xS18mut5-pBT10GUS-d35S-LUC | Momer von Sequenz 18mut5 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5052 | 7616 | 2xS18mut5-pBT10GUS-d35S-LUC | Dimer von Sequenz 18mut5 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5053 | 7617 | 4xS18mut5-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 18mut5 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5054 | 7618 | 1xS18mut6-pBT10GUS-d35S-LUC | Momer von Sequenz 18mut6 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5055 | 7619 | 2xS18mut6-pBT10GUS-d35S-LUC | Dimer von Sequenz 18mut6 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5056 | 7620 | 4xS18mut6-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 18mut6 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5057 | 7621 | 1xS18mut7-pBT10GUS-d35S-LUC | Momer von Sequenz 18mut7 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5058 | 7622 | 2xS18mut7-pBT10GUS-d35S-LUC | Dimer von Sequenz 18mut7 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5059 | 7623 | 4xS18mut7-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 18mut7 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5060 | 7624 | 1xS18mut8-pBT10GUS-d35S-LUC | Momer von Sequenz 18mut8 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5061 | 7625 | 2xS18mut8-pBT10GUS-d35S-LUC | Dimer von Sequenz 18mut8 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5062 | 7626 | 4xS18mut8-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 18mut8 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5097 | 7660 | 1xS18mut9-pBT10GUS-d35S-LUC | Momer von Sequenz 18mut9 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5098 | 7661 | 2xS18mut9-pBT10GUS-d35S-LUC | Dimer von Sequenz 18mut9 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5099 | 7662 | 4xS18mut9-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 18mut9 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5100 | 7663 | 1xS18mut10-pBT10GUS-d35S-LUC | Momer von Sequenz 18mut10 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5101 | 7664 | 2xS18mut10-pBT10GUS-d35S-LUC | Dimer von Sequenz 18mut10 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5102 | 7665 | 4xS18mut10-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 18mut10 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5103 | 7666 | 1xS18mut11-pBT10GUS-d35S-LUC | Momer von Sequenz 18mut11 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5104 | 7667 | 2xS18mut11-pBT10GUS-d35S-LUC | Dimer von Sequenz 18mut11 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5105 | 7668 | 4xS18mut11-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 18mut11 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5162 | 7752 | 1xS18mut19-pBT10GUS-d35S-LUC | Momer von Sequenz 18mut19 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5166 | 7756 | 2xS18mut19-pBT10GUS-d35S-LUC | Dimer von Sequenz 18mut19 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5170 | 7760 | 4xS18mut19-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 18mut19 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5163 | 7753 | 1xS18mut20-pBT10GUS-d35S-LUC | Momer von Sequenz 18mut20 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5167 | 7757 | 2xS18mut20-pBT10GUS-d35S-LUC | Dimer von Sequenz 18mut20 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5171 | 7761 | 4xS18mut20-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 18mut20 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5164 | 7754 | 1xS18mut21-pBT10GUS-d35S-LUC | Momer von Sequenz 18mut21 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5168 | 7758 | 2xS18mut21-pBT10GUS-d35S-LUC | Dimer von Sequenz 18mut21 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |

| | | | |
|------|------|---------------------------------|--|
| 5172 | 7762 | 4xS18mut21-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 18mut21 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5165 | 7755 | 1xS18mut22-pBT10GUS-d35S-LUC | Momer von Sequenz 18mut22 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5169 | 7759 | 2xS18mut22-pBT10GUS-d35S-LUC | Dimer von Sequenz 18mut22 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5173 | 7763 | 4xS18mut22-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 18mut22 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5177 | 7769 | 1xS18mut23-pBT10GUS-d35S-LUC | Momer von Sequenz 18mut23 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5179 | 7771 | 2xS18mut23-pBT10GUS-d35S-LUC | Dimer von Sequenz 18mut23 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5181 | 7773 | 4xS18mut23-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 18mut23 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5178 | 7770 | 1xS18mut24-pBT10GUS-d35S-LUC | Momer von Sequenz 18mut24 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5180 | 7772 | 2xS18mut24-pBT10GUS-d35S-LUC | Dimer von Sequenz 18mut24 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5182 | 7774 | 4xS18mut24-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 18mut24 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4361 | 6809 | 4xS20-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 20 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 3926 | 5906 | 4xS21-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 21 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 3836 | 5776 | 4xS22-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 22 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 3828 | 5768 | 4xS23-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 23 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4130 | 6632 | 4xS24-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 24 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4616 | 7076 | 4xS24mut2-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 24mut2 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4618 | 7078 | 4xS24mut4-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 24mut4 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4619 | 7079 | 4xS24mut5-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 24mut5 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4620 | 7080 | 4xS24mut6-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 24mut6 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4621 | 7081 | 4xS24mut7-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 24mut7 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4782 | | 4xS24mut8-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 24mut8 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4779 | | 4xS24mut9-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von Sequenz 24mut9 in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4975 | 7538 | 1xPR1-650-600-pBT10GUS-d35S-LUC | Monomer des Promotorfragments 650 - 600 bp upstream des ATG von <i>PR1</i> in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4976 | 7539 | 1xPR1-LS7-pBT10GUS-d35S-LUC | Monomer von LS7 des Promotorfragments 650 - 600 bp upstream des ATG von <i>PR1</i> in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4977 | 7540 | 1xPR1-LS8-pBT10GUS-d35S-LUC | Monomer von LS8 des Promotorfragments 650 - 600 bp upstream des ATG von <i>PR1</i> in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4978 | 7541 | 1xPR1-LS9-pBT10GUS-d35S-LUC | Monomer von LS9 des Promotorfragments 650 - 600 bp upstream des ATG von <i>PR1</i> in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4979 | 7542 | 1xPR1-LS10-pBT10GUS-d35S-LUC | Monomer von LS10 des Promotorfragments 650 - 600 bp upstream des ATG von <i>PR1</i> in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4991 | 7558 | 2xPR1-650-600-pBT10GUS-d35S-LUC | Dimer des Promotorfragments 650 - 600 bp upstream des ATG von <i>PR1</i> in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4992 | 7559 | 2xPR1-LS7-pBT10GUS-d35S-LUC | Dimer von LS7 des Promotorfragments 650 - 600 bp upstream des ATG von <i>PR1</i> in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4993 | 7560 | 2xPR1-LS8-pBT10GUS-d35S-LUC | Dimer von LS8 des Promotorfragments 650 - 600 bp upstream des ATG von <i>PR1</i> in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4994 | 7561 | 2xPR1-LS9-pBT10GUS-d35S-LUC | Dimer von LS9 des Promotorfragments 650 - 600 bp upstream des ATG von <i>PR1</i> in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4995 | 7562 | 2xPR1-LS10-pBT10GUS-d35S-LUC | Dimer von LS10 des Promotorfragments 650 - 600 bp upstream des ATG von <i>PR1</i> in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4996 | 7563 | 4xPR1-650-600-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer des Promotorfragments 650 - 600 bp upstream des ATG von <i>PR1</i> in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4997 | 7564 | 4xPR1-LS7-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von LS7 des Promotorfragments 650 - 600 bp upstream des ATG von <i>PR1</i> in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4998 | 7565 | 4xPR1-LS8-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von LS8 des Promotorfragments 650 - 600 bp upstream des ATG von <i>PR1</i> in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |

| | | | |
|-----------|------|--------------------------------|--|
| 4999 | 7566 | 4xPR1-LS9-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von LS9 des Promotorfragments 650 - 600 bp upstream des ATG von <i>PR1</i> in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5000 | 7567 | 4xPR1-LS10-pBT10GUS-d35S-LUC | Tetramer von LS10 des Promotorfragments 650 - 600 bp upstream des ATG von <i>PR1</i> in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4776 | | S1-pBT10GUS-d35S-LUC | Natives Promotorfragment 230 bp upstream des ATG von <i>WRKY30</i> ohne Minimalpromotor in pBT10GUS-d35S-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5065 | 7356 | pRT103-GUS | pRT103-GUS Vektor in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4630 | 7359 | pBT10-LUC | Reportergenvektor pBT10-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4629 | 7358 | 4xD-pBT10-LUC | Tetramer des D-Elements in pBT10-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4628 | 7357 | 4xS15-pBT10-LUC | Tetramer des S15-Elements in pBT10-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4826 | 7266 | 4xS15mut4-pBT10-LUC | Tetramer des S15mut4-Elements in pBT10-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4827 | 7267 | 4xS15mut5-pBT10-LUC | Tetramer des S15mut5-Elements in pBT10-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4692 | 7115 | 4xS15mutd-pBT10-LUC | Tetramer des S15mutd-Elements in pBT10-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 5030 | 7596 | 4xS18-pBT10-LUC | Tetramer des S18-Elements in pBT10-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4447 | | 4xS24-pBT10-LUC | Tetramer des S24-Elements in pBT10-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4802 | | 4xS24mut5-pBT10-LUC | Tetramer des S24mut5-Elements in pBT10-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4804 | | 4xS24mut9-pBT10-LUC | Tetramer des S24mut9-Elements in pBT10-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4830 | | S1-pBT10-LUC | Tetramer des S1-Elements in pBT10-LUC in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4755 | | pREP4 | LacI Repressorvektor pREP4 in XL4 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4377 | 6950 | pQE30 | Bakterieller Expressionsvektor pQE30 in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4378 | 6952 | pQE31 | Bakterieller Expressionsvektor pQE31 in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4379 | 6951 | pQE32 | Bakterieller Expressionsvektor pQE32 in XL1 Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |
| 4967 | 7534 | p65-pQE31 + pREP4 | Die Vektoren p65-pQE31 und pREP4 im Expressionsstamm BL21. Resistenz Carbenicillin und Kanamycin |
| 5034 | | WRKY26-pQE32 + pRAP4 + pRARE | WRKY26-pQE32, pRAP4 und pRARE in Expressionsstamm BL21. Resistenz Carbenicillin, Kanamycin und Chloramphenicol |
| 4936 | 7476 | UBQ10:sXVE:HA _c | Pflanzlicher Expressionsvektor reguliert durch β -Estrogen über eine XVE-Kassete. Vektor aus der AG Kudla. Resistenz Kanamycin |
| 4962 | 7504 | p65-UBQ10:sXVE:HA _c | cDNA des murinen NF- κ B p65 Transkriptionsfaktor in UBQ10:sXVE:HA _c in XL1 Blue MRF'. Resistenz Kanamycin |
| 4969 | 7504 | p65-UBQ10:sXVE:HA _c | cDNA des murinen NF- κ B p65 Transkriptionsfaktor in UBQ10:sXVE:HA _c in <i>A. tumefaciens</i> C58C1. Resistenz Carbenicillin, Kanamycin und Rifampicin |
| 3912-3914 | 5870 | TF <i>only-library</i> | <i>A. thaliana</i> Transkriptionsfaktor <i>only-library</i> (Mitsuda <i>et al.</i> , 2010) in XL Blue MRF'. Resistenz Carbenicillin |

Tabelle 47: Auflistung der verwendeten und erstellten Glycerinkulturen in Hefe

| Nummer | Name | Beschreibung |
|--------|------------------------------|---|
| 5160 | positiv Kontrolle Y1H Screen | p53His2 + pGAD-Rec2-53 in Y1HGold. Positiv Kontrolle für Y1H Screen. Selektion auf SD-Medium -Leu/-Trp |
| 5161 | negativ Kontrolle Y1H Screen | pHis2.1 + pGAD-Rec2-53 in Y1HGold. Negativ Kontrolle für Y1H Screen. Selektion auf SD-Medium -Leu/-Trp |
| 5042 | 4xS18-pHIS2.1 | Tetramer von S18 in pHIS2.1 in Y1HGold. Selektion auf SD-Medium -Trp. 50 mM 3-AT inhibiert das Hintergrundwachstum |
| 5155 | 4xS18mut1-pHIS2.1 | Tetramer von S18mut1 in pHIS2.1 in Y1H Gold. Selektion auf SD-Medium -Trp. 50 mM 3-AT inhibiert das Hintergrundwachstum |
| 5156 | 4xS18mut2-pHIS2.1 | Tetramer von S18mut2 in pHIS2.1 in Y1H Gold. Selektion auf SD-Medium -Trp. 50 mM 3-AT inhibiert das Hintergrundwachstum |
| 5047 | 4xS18mut3-pHIS2.1 | Tetramer von S18mut3 in pHIS2.1 in Y1H Gold. Selektion auf SD-Medium -Trp. 50 mM 3-AT inhibiert das Hintergrundwachstum |
| 5106 | 4xS18mut4-pHIS2.1 | Tetramer von S18mut4 in pHIS2.1 in Y1H Gold. Selektion auf SD-Medium -Trp. 50 mM 3-AT inhibiert das Hintergrundwachstum |
| 5107 | 4xS18mut5-pHIS2.1 | Tetramer von S18mut5 in pHIS2.1 in Y1H Gold. Selektion auf SD-Medium -Trp. 50 mM 3-AT inhibiert das Hintergrundwachstum |
| 5108 | 4xS18mut6-pHIS2.1 | Tetramer von S18mut6 in pHIS2.1 in Y1H Gold. Selektion auf SD-Medium -Trp. 50 mM 3-AT inhibiert das Hintergrundwachstum |

| | | |
|------|----------------------------|---|
| 5109 | 4xS18mut7-pHIS2.1 | Tetramer von S18mut7 in pHIS2.1 in Y1H Gold. Selektion auf SD-Medium -Trp. 50 mM 3-AT inhibiert das Hintergrundwachstum |
| 5110 | 4xS18mut8-pHIS2.1 | Tetramer von S18mut8 in pHIS2.1 in Y1H Gold. Selektion auf SD-Medium -Trp. 50 mM 3-AT inhibiert das Hintergrundwachstum |
| 5068 | 4xS18-pHIS2.1 + PreyWRKY40 | Tetramer von S18 in pHIS2.1 und WRKY40 in pDEST_GAD424 in Y1H-Gold. Wachstum auf SD-Medium -Trp/-Leu/-His + 50 mM 3-AT |

9.2. Primer und Oligonukleotide

Tabelle 48: Auflistung der verwendeten Primer

| Nummer | Name | Sequenz | Beschreibung |
|--------|---------------------|-----------------------------|---|
| 7445 | MS23 GUS-LUC-4301-f | GGAAAACTCGACGCAAGAAA | Forward Primer zur Überprüfung der Klonierung von cis-Elementen in pBT10-GUS/LUC |
| 7446 | MS23 GUS-LUC-4826-r | GGTTTCTACAGGACGACCA | Reverse Primer zur Überprüfung der Klonierung von cis-Elementen in pBT10-GUS/LUC |
| 7346 | GUS75 | GCGATCCAGACTGAATGCC | Primer zur OrientierungsPCR der cis-Elemente in pBT10-GUS/LUC |
| 7249 | EMSA-f | GCGCGGTGTCATCTATGTTA | Forward Primer zur Amplifikation des Tetramers von cis-Sequenzen, um diese in den Vektor pBT10-LUC zu klonieren |
| 7250 | EMSA-r | GAGCGTGCTCTCCAAATG | Reverse Primer zur Amplifikation des Tetramers von cis-Sequenzen, um diese in den Vektor pBT10-LUC zu klonieren |
| 7251 | pBT10-LUC_1794-f | GGCCTTTTGCTCACATGTC | Forward Primer zur Amplifikation des Tetramers von cis-Sequenzen, die in den Vektor pBT10-LUC zu kloniert wurden |
| 7252 | pBT10-LUC_2286-r | ATTCCGCGTACGTGATGTC | Reverse Primer zur Amplifikation des Tetramers von cis-Sequenzen, die in den Vektor pBT10-LUC zu kloniert wurden |
| 6419 | Bait_right GUSLUC | GCGAGCTCTCTGCGGTCGACTCTA | Forward Primer zur Amplifikation von cis- Elementen aus pBT10GUS-LUC. Zur Subklonierung in pHIS2.1 |
| 6420 | Bait_left GUSLUC | ATCGGGAATTAGATCTGTC | Reverse Primer zur Amplifikation von cis- Elementen aus pBT10GUS-LUC. Zur Subklonierung in pHIS2.1 |
| 5121 | pHis_left | TGGCAAGTGAGCGGTCA | Forward Primer zur Amplifikation von cis- Elementen aus pHIS2.1 |
| 5122 | pHis_right | TCGTTTATCTTGCTGCTCAT | Reverse Primer zur Amplifikation von cis- Elementen aus pHIS2.1 |
| 6083 | pORE_O2_4719_f | GATCTCCCAGTCACGACGTT | Forward Primer zur Überprüfung der Klonierung von cDNA in den pORE Vektor |
| 6084 | pORE_O2_4923_r | GATCACGCGTAGCGGATAAC | Reverse Primer zur Überprüfung der Klonierung von cDNA in den pORE Vektor |
| 7448 | pORE_O2_8100_f | GACGCACAATCCACTATCC | Primer zur Sequenzierung von Klonen in pORE Vektor |
| 5807 | pQE-fwd | CGGATAACAATTCACACAG | Forward Primer zur Überprüfung von Klonierungen in pQE Vektoren mittels Kolonie-PCR |
| 5808 | pQE-rev | GTTCTGAGGTCATTACTGG | Reverse Primer zur Überprüfung von Klonierungen in pQE Vektoren mittels Kolonie-PCR |
| 7496 | UBQ10_XVE_MCS_HA_f | GGATATGTATATGGTGGTAATGC | Forward Primer für Kolonie-PCR und Sequenzierung von UBQ10_sXVE Vektoren |
| 7497 | UBQ10_XVE_MCS_HA_r | CATGCTTAACGTAATCAACAG | Reverse Primer für Kolonie-PCR und Sequenzierung von UBQ10_sXVE Vektoren |
| 6148 | GAL4AD_RV | CGTTTTAAACCTAAGAGTCAC | Reverse Primer zur Amplifikation des cDNA Inserts positiver selektierter Klone aus der TF <i>only-library</i> (pDEST-GAD424) (Mitsuda et al., 2010) |
| 6149 | GAL4AD | CTATTCGATGATGAAGATACCCC | Forward Primer zur Amplifikation des cDNA Inserts positiver selektierter Klone aus der TF <i>only-library</i> (pDEST-GAD424) (Mitsuda et al., 2010) |
| 7087 | Prey_attB_fwd | AAGCAGGCTTCATG | Primer zur Sequenzierung der cDNA ausgewählter Klone vom Yeast One-Hybrid Screens |
| 7095 | AtWRKY26 F | GGATCCATTGATGGGCTCTTTGATCG | Forward Primer zur Amplifikation von WRKY26 mit BamHI Schnittstelle |
| 7096 | AtWRKY26 R | GGTACCGGCGCATGATTAAGGAAACA | Reverse Primer zur Amplifikation von WRKY26 mit KpnI Schnittstelle |
| 7091 | AtWRKY40 F | GGATCCACATGGATCAGTACTCATCCT | Forward Primer zur Amplifikation von WRKY40 mit BamHI Schnittstelle |

| | | | |
|------|-------------------|--------------------------------------|--|
| 7092 | AtWRKY40 R | GGTACCGAATGTATTGGAGATTGT | Reverse Primer zur Amplifikation von WRKY40 mit EcoRI Schnittstelle |
| 7093 | AtWRKY41 F | GAGCTCAAATGGAAATGATGAATTGGGAGC | Forward Primer zur Amplifikation von WRKY41 mit SacI Schnittstelle |
| 7094 | AtWRKY41 R | GGTACCGTACTACTTAAATCGAATTGTGG | Reverse Primer zur Amplifikation von WRKY41 mit KpnI Schnittstelle |
| 7573 | WRKY26_BamHI_f | CGGGATCCATGGGCTCTTTTGATCGC | Forward Primer zur Amplifikation von WRKY26 mit Schnittstelle BamHI |
| 7574 | WRKY26_KpnI_r | GGGGTACCTTATGTC TCTGTTTTTCCAAG | Reverse Primer zur Amplifikation von WRKY26 mit Schnittstelle KpnI |
| 7645 | WRKY40_BamHI_f | CGGGATCCATGGATCAGTACTCATCCTC | Forward Primer zur Amplifikation von WRKY40 mit BamHI Schnittstelle |
| 7646 | WRKY40_EcoRI_r | CGGAATTCCTATTTCTCGGTATGATTCTG | Reverse Primer zur Amplifikation von WRKY40 mit EcoRI Schnittstelle |
| 7571 | WRKY41_SacI_f | GGGAGCTCATGGAAATGATGAATTGGGAG | Forward Primer zur Amplifikation von WRKY41 mit Schnittstelle SacI |
| 7572 | WRKY41_KpnI_r | GGGGTACCTTAAATCGAATTGTGGAAAAAAG | Reverse Primer zur Amplifikation von WRKY41 mit Schnittstelle KpnI |
| 7366 | Gal4AD_XbaI_for | GCTCTAGAATGGATAAAGCGGAATTAATTCC | Forward Primer zur Klonierung der SV40-Gal4AD-Domäne mit XbaI Schnittstelle |
| 7367 | Gal4AD_BamHI_rev | CGGGATCCCTCTTTTTTGGGTTTGGTGGG | Reverse Primer zur Klonierung der SV40-Gal4AD-Domäne mit BamHI Schnittstelle |
| 7372 | p65_EcoRI_f | CGGAATTCATGGACGATCTGTTCCCTCATC | Forward Primer zur Amplifikation der murinen NFκB p65 cDNA mit der Schnittstellen EcoRI |
| 7461 | p65_Sall_r | GCGTCGACTTAGGAGCTGATCTGACTCAAAG | Reverse Primer zur Amplifikation der murinen NFκB p65 cDNA mit der Schnittstellen Sall |
| 7373 | p65_XhoI_r | CGCTCGAGTTAGGAGCTGATCTGACTCAAAGAG | Reverse Primer zur Amplifikation der murinen NFκB p65 cDNA mit der Schnittstellen XhoI |
| 7455 | SV40_EcoRI_rev | CG GAATTC GGCGGTACCCAATTCGACCT | Reverse Primer zur Amplifikation von SV40 mit EcoRI Schnittstelle |
| 7500 | GAL4AD_ATG_XbaI_f | GCTCTAGAATGAATTTTAATCAAAGTGGGAATATTG | Forward Primer zur Amplifikation von GAL4AD (ohne SV40) mit Schnittstelle XbaI |
| 7501 | GAL4AD_EcoRI_r | CGGAATTCCTGGCTCCATGGCCAT | Reverse Primer zur Amplifikation von GAL4AD (ohne SV40) mit Schnittstelle EcoRI |
| 7462 | p65_XbaI_f | GCTCTAGAATGGACGATCTGTTCCCTCATC | Forward Primer zur Amplifikation der murinen NFκB p65 cDNA mit der Schnittstellen XbaI |
| 7495 | P65_oSTOP_XhoI_r | CGCTCGAGGGAGCTGATCTGACTCAAAGAG | Reverse Primer zur Amplifikation der murinen NFκB p65 cDNA ohne Stop-Codon mit der Schnittstellen XhoI |
| 7499 | P65_Sall_f | GCGTCGACATGGACGATCTGTTCCCTCATC | Forward Primer zur Amplifikation der murinen NFκB p65 cDNA mit der Schnittstellen Sall |
| 7460 | p65_HindIII_r | CCCAAGCTTTTTAGGAGCTGATCTGACTCAAAG | Reverse Primer zur Amplifikation der murinen NFκB p65 cDNA mit der Schnittstellen HindIII |
| 7360 | Actin2 f | TGGATTGCAGGAGATGATG | Forward Primer für eine semiquantitative RT-PCR von Actin2 |
| 7361 | Actin2 r | AGACGGAGGATGGCATGAG | Reverse Primer für eine semiquantitative RT-PCR von Actin2 |
| 7362 | PR1 f | GTAGGTGCTCTTGTCTTCCC | Forward Primer für eine semiquantitative RT-PCR von PR1 |
| 7363 | PR1 r | CACATAATCCACGAGGATC | Reverse Primer für eine semiquantitative RT-PCR von PR1 |
| 7608 | DJ1E_RT-PCR_f | CTCTCCGGCGGTGAGTGGTG | Forward Primer für eine semiquantitative RT-PCR von DJ1E |
| 7609 | DJ1E_RT-PCR_r | CCACACATATATCATCCCACG | Reverse Primer für eine semiquantitative RT-PCR von DJ1E |
| 7610 | WRKY30_RT-PCR_f | CGAAGAAGTCAATGCCAAGGTG | Forward Primer für eine semiquantitative RT-PCR von WRKY30 |
| 7611 | WRKY30_RT-PCR_r | GACAATGGATAGTGAAGGTTGTG | Reverse Primer für eine semiquantitative RT-PCR von WRKY30 |
| 7716 | S20_RT_f | CGCCTTACCAAAGATTCCTG | Forward Primer für eine semiquantitative RT-PCR von AT5G12930 |
| 7717 | S20_RT_r | CATGATCTGAGACCTTTGATAC | Reverse Primer für eine semiquantitative RT-PCR von AT5G12930 |
| 7718 | S18_RT_F | ATGAAAAGTTCATCGGAGCTCC | Forward Primer für eine semiquantitative RT-PCR von AT1G76960 |
| 7719 | S18_RT_R | TCATGGACGGCAATACGGTG | Reverse Primer für eine semiquantitative RT-PCR von AT1G76960 |
| 7720 | AT1G11980_RT_f | ATGGAGATCAAAGTGAAGACTC | Forward Primer für eine semiquantitative RT-PCR von AT1G11980 |

| | | | |
|------|----------------|-------------------------|---|
| 7721 | AT1G11980_RT_r | TAGCAACAACCACCTCTAAGG | Reverse Primer für eine semiquantitative RT-PCR von AT1G11980 |
| 7722 | AT1G63750_RT_f | GGGATTTCGGGATCGCTTTC | Forward Primer für eine semiquantitative RT-PCR von AT1G63750 |
| 7723 | AT1G63750_RT_r | CCTTTGATGGTGTAGCATTAAAG | Reverse Primer für eine semiquantitative RT-PCR von AT1G63750 |
| 7724 | AT2G32340_RT_f | CGAATCCACAGCTGAGGGTG | Forward Primer für eine semiquantitative RT-PCR von AT2G32340 |
| 7725 | AT2G32340_RT_r | CCACATGTATATCATTTCCATCC | Reverse Primer für eine semiquantitative RT-PCR von AT2G32340 |
| 7726 | AT4G30996_RT_f | GGATCCACACGTGCCAACTC | Forward Primer für eine semiquantitative RT-PCR von AT4G30996 |
| 7727 | AT4G30996_RT_r | GCAACTGCTTCTGCAGCTTC | Reverse Primer für eine semiquantitative RT-PCR von AT4G30996 |

Tabelle 49: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

| Nummer | Name | Sequenz |
|--------|------------|--|
| 6908 | S15mut3_f | CTAGTAGGACTTTTCACCAAGTTGGACTTTGGGATTGTTGGT |
| 6909 | S15mut3_r | CTAGACCAACAATCCCAAAGTCCAAGTGGTGAAAAGTCCTA |
| 5897 | S24_f | CTAGTTGGTCAGCATGTTGGACTTTCCAAATTCATTGACCA |
| 5898 | S24_r | CTAGAGGTCAATGAATTTGGAAAGTCCAACATGCTGACCAA |
| 7058 | S24mut2_f | CTAGTTAACTGGCATGTTGGACTTTCCAAATTCACCAAGTTT |
| 7059 | S24mut2_r | CTAGAAACTGGTGAATTTGGAAAGTCCAACATGCCAGTTAA |
| 7064 | S24mut5-f | CTAGTTGGTCAGCATGTTAAGTCCCTTAAATTCATTGACCT |
| 7065 | S24mut5-r | CTAGAGGTCAATGAATTTAAGGGACTTAACATGCTGACCAA |
| 7068 | S24mut7_f | CTAGTTAACTGGCATGTTAAGTCCCTTAAATTCACCAAGTTT |
| 7069 | S24mut7_r | CTAGAAACTGGTGAATTTAAGGGACTTAACATGCCAGTTAA |
| 5113 | S18_f | CTAGTTAATTTCTCTTGCCTAGAAAAGTCTGATCGGGAAGT |
| 5114 | S18_r | CTAGACTTCCCGATCAGACTTTTCTACGCAAGAGAAATTAA |
| 7463 | S18mut1_f | CTAGTTAATTTCTCTTGCCTAGGGGCTCTGATCGGGAAGT |
| 7464 | S18mut1_r | CTAGACTTCCCGATCAAGAGCCCTACGCAAGAGAAATTAA |
| 7465 | S18mut2_f | CTAGTTAATTTCTCTTGCCTAGAAAAGTCTAGCTAAAAAGT |
| 7466 | S18mut2_r | CTAGACTTTTTAGCTAGACTTTTCTACGCAAGAGAAATTAA |
| 7599 | S18mut3_f | CTAGTTAATTTCTCTTGCCTAGAAAAGTCTGATCGGGAAGT |
| 7600 | S18mut3_r | CTAGACTTCCCGATCTGACTTTTCTACGCAAGAGAAATTAA |
| 7627 | S18mut4_f | CTAGTTAATTTCTCTTGCCTAGAAAAGTCTGATTAAAGGTT |
| 7628 | S18mut4_r | CTAGAACCTTTAATCAGACTTTTCTACGCAAGAGAAATTAA |
| 7629 | S18mut5_f | CTAGTTAATTTCTCTTGCCTAGAAAAACTCAGCCGGGAAGT |
| 7630 | S18mut5_r | CTAGACTTCCCGCTGAGTTTTTCTACGCAAGAGAAATTAA |
| 7631 | S18mut6_f | CTAGTTAATTTCTCTTGCCTAGGGGGTCTGATCGGGAAGT |
| 7632 | S18mut6_r | CTAGACTTCCCGATCAGACCCCTCGCGCAAGAGAAATTAA |
| 7633 | S18mut7_f | CTAGTTAATTTCTCCATATAGAAAAGTCTGATCGGGAAGT |
| 7634 | S18mut7_r | CTAGACTTCCCGATCAGACTTTTCTATATGGAGGAAATTAA |
| 7635 | S18mut8_f | CTAGTCGGCCCTTCTTGCCTAGAAAAGTCTGATCGGGAAGT |
| 7636 | S18mut8_r | CTAGACTTCCCGATCAGACTTTTCTACGCAAGAAGGCCGA |
| 7639 | S18mut9_f | CTAGTTAATTTCTCTTGCCTAGAAAAGTCTGGCTGGGAAGT |
| 7640 | S18mut9_r | CTAGACTTCCAGCCAGACTTTTCTACGCAAGAGAAATTAA |
| 7641 | S18mut10_f | CTAGTGGGGGGTCTTGCCTAGAAAAGTCTGATCGGGAAGT |
| 7642 | S18mut10_r | CTAGACTTCCCGATCAGACTTTTCTACGCAAGACCCCCCA |
| 7643 | S18mut11_f | CTAGTAAAAAATCTTGCCTAGAAAAGTCTGATCGGGAAGT |

| | | |
|------|---------------|---|
| 7644 | S18mut11_r | CTAGACTTCCCGATCAGACTTTTCTACGCAAGATTTTTTTA |
| 7744 | S18mut19_f | CTAGTCGGCCCTTCTTGCGTAGAAAAAGTCTGATTAAAGGTT |
| 7745 | S18mut19_r | CTAGAACCTTTAATCAGACTTTTCTACGCAAGAAGGGCCGA |
| 7746 | S18mut20_f | CTAGTCGGCCCTTCTTGCGTAGAAAAACTCAGCCGGGAAGT |
| 7747 | S18mut20_r | CTAGACTTCCCGGCTGAGTTTTTCTACGCAAGAAGGGCCGA |
| 7748 | S18mut21_f | CTAGTCGGCCCTTCTTGCGGAGGGGGTCTGATCGGGAAGT |
| 7749 | S18mut21_r | CTAGACTTCCCGATCAGACCCCTCGCGCAAGAAGGGCCGA |
| 7750 | S18mut22_f | CTAGTCGGCCCTCTCCATATAGAAAAGTCTGATCGGGAAGT |
| 7751 | S18mut22_r | CTAGACTTCCCGATCAGACTTTTCTATATGGAGAGGGCCGA |
| 7765 | S18mut23_f | CTAGTCGGCCCTTCTTGCGTAGGGGCTCTTGATCGGGAAGT |
| 7766 | S18mut23_r | CTAGACTTCCCGATCAAGAGCCCTACGCAAGAAGGGCCGA |
| 7767 | S18mut24_f | CTAGTCGGCCCTTCTTGCGTAGAAAAAGTCTAGCTAAAAAGT |
| 7768 | S18mut24_r | CTAGACTTTTCTAGCTAGACTTTTCTACGCAAGAAGGGCCGA |
| 7511 | PR1_650-600_f | CTAGTTACTTACGTCATAGATGTGGCGGCATATATTCTTCAGGACTTTTCAGCCATT |
| 7512 | PR1_650-600_r | CTAGAATGGCTGAAAAGTCCTGAAGAATATATGCCGCCACATCTATGACGTAAGTAA |
| 7513 | PR1_LS7_f | CTAGTTACTTGTACTGCGAGTGTGGCGGCATATATTCTTCAGGACTTTTCAGCCATT |
| 7514 | PR1_LS7_r | CTAGAATGGCTGAAAAGTCCTGAAGAATATATGCCGCCACACTCGCAGTACAAGTAA |
| 7515 | PR1_LS8_f | CTAGTTACTTACGTCATAGACACAATAATCTATATTCTTCAGGACTTTTCAGCCATT |
| 7516 | PR1_LS8_r | CTAGAATGGCTGAAAAGTCCTGAAGAATATAGATTATTGTGTCTATGACGTAAGTAA |
| 7517 | PR1_LS9_f | CTAGTTACTTACGTCATAGATGTGGCGGCAGCGCGGAGGAAGGACTTTTCAGCCATT |
| 7518 | PR1_LS9_r | CTAGAATGGCTGAAAAGTCCTCCTCCGCGCTGCCGCCACATCTATGACGTAAGTAA |
| 7519 | PR1_LS10_f | CTAGTTACTTACGTCATAGATGTGGCGGCATATATTCTTCCTTACCCCTAGCCATT |
| 7520 | PR1_LS10_r | CTAGAATGGCTAGGGGTGAAGGAAGAATATATGCCGCCACATCTATGACGTAAGTAA |

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Mentor Prof. Dr. Reinhard Hehl, welcher es mir ermöglicht hat sowohl meine Master- als auch meine Doktorarbeit mit jeweils einem interessanten Thema zu erstellen. Als Mentor hat er mich hervorragend betreut und gefördert. Vielen Dank für alle Ratschläge, Hinweise und konstruktiven Vorschläge, die zum Gelingen dieser Arbeit beigesteuert haben. Ebenfalls möchte ich mich für die Möglichkeit an den Teilnahmen verschiedener national und internationaler Konferenzen bedanken.

Bei Prof. Dr. Karsten Hiller möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats bedanken.

Auch bei Prof. Dr. André Fleißner ein herzliches Dankeschön für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Zudem möchte ich mich bei der ganzen Abreitsgruppe Hehl für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Bei Elke Faurie möchte ich mich herzlich für die experimentelle Unterstützung im Labor sowie für die unterhaltsamen Pläusche zwischendurch bedanken. Bei Mona Lyubchenko und Do Xuan Dong möchte ich mich danken, dass ich als Arbeitskollege sofort aufgenommen wurde und ihr mir jegliche Unterstützung habt zukommen lassen. Artyom Romanov danke ich für alle Hilfe bei sämtlichen Computerproblemen. Vielen Dank auch an Leo Norval, Shahrokh Karimpour, Lisa Lenitzki, Anika Möller, Jessica Grube, Ann-Kathrin Bahlmann, Alexander Sandmann, Marcel Staar, Lena Meißner, Claudia Strauch und Laureen Arndt für die experimentellen Ergebnisse eurer Bachelor- bzw. Masterarbeiten. Die Laborzeit mit euch war immer schön und hat Spaß gemacht.

Außerdem möchte ich mich beim ganzen Institut für Genetik bedanken. Die verschiedenen Betriebsausflüge, Weihnachtsfeiern, Kaffee- und Kuchenpausen und Gespräche waren immer schön.

Bei meiner Familie möchte ich mich herzlich für die Unterstützung in jeglicher Lebenslage bedanken. Durch sie wurde mein Studium und auch mein Auslandspraktikum erst ermöglicht. Vielen Dank für die Unterstützung während der Doktorarbeit und dass ihr immer für mich da seid.

Meiner Frau Inga möchte ich herzlich danken, dass wir zusammen das Studium gemeistert haben und sie mich in der ganzen Zeit der Doktorarbeit unterstützt hat. Danke, dass du mich immer aufgebaut und motiviert und meine Gedanken zu Laborexperimenten verstanden hast. Danke, dass du immer für mich da bist